



División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Maestría en Ciencias e Ingeniería de Materiales

“Inhibición de Materiales Biocatalíticos: Estudio
Calorimétrico de la Unión del 3-D-fosfoglicerato
a la Triosafofato Isomerasa”.

Tesis que para obtener el título de Maestro
en Ciencias e Ingeniería de Materiales
presenta:

Ing. Víctor Iván Cortés Pavía

Asesores:

Dra. Julia Aguilar Pliego

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Marzo 2018

CEP

Agradecimientos:

Este trabajo fue realizado en área de Biofísicoquímica de la universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa gracias al apoyo de CONACYT con el número de beca: (617143).

Al Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna. Por haberme brindado su paciencia y su apoyo en la realización de este trabajo, así como durante mi estancia en la UAM-I.

Ala Dra. Julia Aguilar Pliego. Por aceptarme como parte de su grupo de investigación y darme el respaldo en la conclusión de mis estudios de maestría, siempre le estaré muy agradecido por sus valiosos consejos.

Ala Dra. Jaqueline Padilla Zúñiga. Por sus valiosos comentarios y observaciones en este trabajo.

Al Dr. Ponciano García Gutiérrez. Por sus aportaciones en la realización de esta tesis y brindarme siempre su apoyo

Ala Dra. Virginia González Vélez. Por sus valiosos comentarios y sugerencias en este trabajo.

Al Dr. Andrés Hernández Arana. Por brindarme su apoyo durante mi estancia en la UAM-I, así como sus valiosos consejos en la termodinámica de proteínas.

Al Dr. Francisco Reyes Espinoza. Por su ayuda en la expresión como en la purificación de la proteína, así como el brindarme la oportunidad de contar con su amistad.

Al Dr. Menandro Camarillo Cadena. Por sus comentarios y su ayuda en mi formación en la parte experimental en proteínas.

Ala Dra. Iraís Vera Robles. Por su valiosa ayuda en la parte de biología molecular así como sus valiosas aportaciones durante mi estancia en la UAM-I.

Ala Dra. Silvia Solís Mendiola. Por sus recomendaciones, consejos y brindarme siempre su apoyo.

Ala Dra. Teresa Vieyra Eusebio. Por sus valiosos comentarios y su ayuda en la parte experimental en calorimetría de titulación Isotérmica.

Al Dr. Alberto Rubio Ponce. Por sus valiosos consejos y darme su apoyo en todo momento cuando fue coordinador del posgrado.

Ala Dra. Sandra Loera Serna, por bríndame sus pláticas, así como de darme confianza en mi persona para trabajar en proteínas.

Ala Dra. Deyanira Ángeles Beltrán por brindarme su confianza y haberme hecho sentir en la UAM-A como mi hogar.

Este trabajo está dedicado a mis Padres: Bertha Pavía Fuentes y Luciano Cortés Larios. Quienes me han brindado siempre su amor y apoyo incondicional durante mi vida, siempre los tengo presentes en mi mente y corazón. Para mí siempre serán un ejemplo de vida, así como una inspiración hacia la búsqueda de nuevos horizontes.

A mis familiares y hermanos que siempre me han mostrado su apoyo y confianza en especial a mi hermano Fred Alán, Ana Bertha, María Elena los cuales siempre los llevo en mi pensamiento y corazón.

A mis compañeros de la UAM-A; con los cuales pase pláticas y momentos muy amenos: Arnulfo Montoya, Javier Antúnez, Ismael Soto, Miguel Gálvez, Myriam Ballesteros, Rodolfo Sánchez, Santiago Arellano y Teresa Sánchez.

A mis compañeros de la UAM-I; los cuales siempre se mostraron su apoyo así como su calidez: Ariadna Labastida, Armin Hernández, Arnulfo Vidrio, David Tovar, Isela de la Cruz, Jaqueline González, Jessica Martínez, Jhoanna Cansino, Mario Flores, y Roberto Flores.

A mis amigos con los cuales siempre he contado con su amistad y su gran apoyo en cualquier circunstancia : Ángel Alva, Arturo Cedillo, Diego Espíndola, Joel Cedillo, Gabriel Garibi, Gustavo Zelocuatecatl, Miguel Hesiquio, Rosalía Gómez, Víctor Méndez y Thomas Hörner,

A todos los hombres y mujer que nos dieron patria y libertad los cuales, han luchado para que tengamos un país libre, donde la educación es un derecho.

“El derecho de rebelión es sagrado”. Ricardo Flores Magón.

INDICE DE CONTENIDOS

Resumen.....	2
Abstract.....	3
CAPITULO I INTRODUCCIÓN. CIENCIA E INGENIERIA DE MATERIALES	4
1.1 Ciencia e Ingeniería de Materiales	3
1.2 Materiales blandos.	7
1.3 Reconocimiento molecular.....	8
1.4 Interacciones proteína inhibidor	10
1.5 Termodinámica en el reconocimiento molecular proteína-inhibidor	15
1.6 Triosafosfato isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.7 Inhibidores de la TIM.....	23
CAPITULO III OBJETIVOS.....	24
OBJETIVOS GENERAL:	24
OBJETIVOS ESPECIFICOS:	24
CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS	25
3.1 Expresión de la TIM.....	25
3.1.2 Protocolo de transformación para BL21 (DE3) emplantando células competentes (C2527).	28
3.2 Etapas de expresión y purificación de Triosafosfato Isomerasa de levadura TIM.....	28
3.3 Determinación de la concentración de la ScTIM.	30
3.4 Espectroscopía de Dicroísmo Circular.....	32
3.5 Espectrometría de masas.	33
3.6 Actividad enzimática de la ScTIM.....	33
3.7 Espectroscopía de fluorescencia.....	35
3.8 Calorimetría de titulación isotérmica.	36
CAPITULO IV: RESULTADOS	39
4.1 Expresión y purificación de la ScTIM	40
4.2 Espectro de dicroísmo circular de la ScTIM silvestre.....	45
4.3 Espectro de masas de la ScTIM silvestre.	46
4.4 Ensayo de actividad enzimática de la ScTIM.....	47

4.5 Espectro de fluorescencia: ScTIM libre y complejo ScTIM-3PG.....	49
4.6 Calorimetría de titulación isotérmica.	50
CAPITULO V: DISCUSIÓN	51
Conclusiones:.....	53
Perspectivas:	54
Bibliografía:	55
Glosario de términos:.....	62

ABREVIATURAS

α -GP	α -glicerofosfato
α -GDH	α -glicerofosfato deshidrogenasa
ΔC_p	Capacidad calorífica de la unión proteína-inhibidor
DC	Dicroísmo circular
CTI	Calorimetría de titulación isotérmica
DGAP	D-gliceraldehído-3-fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
2PG	2-fosfoglicolato
3PG	3-D-fosfoglicerato
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
Ec.	Ecuación
ϵ	Constante dieléctrica
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
ΔG_u	Energía libre de Gibbs de la unión proteína-inhibidor
ΔH_u	Entalpía de unión proteína-inhibidor
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
k_{cat}	Número de recambio
k_{cat}/K_M	Eficiencia catalítica
K_I	Constante de inhibición
K_M	Constante de Michaelis

K_u	Constante de unión proteína-inhibidor
LB	Medio Luria Bertani
n	Número de sitios de unión
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
P-L	Proteína-Ligando
PDB	Protein Data Bank
PGH	Fosfoglicolohidroxamato
θ_N	Elípticas en el estado nativo
TEA	Amortiguador Tris-HCl/NaCl
TIM	Triosafofato Isomerasa
ScTIM	Triosafofato Isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
V_{max}	Velocidad máxima

Resumen

Dentro del área de los materiales blandos, los biocatalizadores han resultado de gran interés debido a sus aplicaciones en los campos de la terapéutica y de la industria alimentaria. El objeto de estudio de este proyecto es el biocatalizador denominado triosafofosfato isomerasa (TIM), que es una de las enzimas de la ruta metabólica denominada glucólisis, catalizando la reacción de isomerización entre el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetonafofosfato. Varios parásitos humanos dependen completamente de la glucosa sanguínea de su hospedero, utilizando la glucólisis para obtener toda su energía. Por ello, la TIM representa un blanco farmacológico apropiado para diseñar nuevos inhibidores que sirvan como fármacos para erradicar estas enfermedades parasitarias. El presente trabajo tiene como propósito caracterizar la unión del inhibidor 3-D-fosfoglicerato a la TIM de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), ScTIM, mediante la técnica de calorimetría de titulación isotérmica, determinando los parámetros termodinámicos del proceso de unión (ΔG , ΔH y ΔS). Dado que se conoce la estructura cristalográfica de la enzima libre y de complejos de la ScTIM con los inhibidores 2-fosfoglicolato y fosfoglicolohidroxamato, podremos obtener un modelo del complejo ScTIM-3-fosfoglicerato y tratar de correlacionar los parámetros termodinámicos de unión obtenida en la interacción molecular observada en dicho complejo. El conocimiento detallado del proceso de inhibición permitirá diseñar nuevos inhibidores con posible actividad farmacológica.

Abstract

Within the area of soft materials, biocatalysts have been of great interest because of their applications in the fields of therapeutics and food industry. The subject matter of this project is the biocatalyst triosephosphate isomerase called (TIM), which is one of the enzymes of the metabolic pathway called glycolysis, catalyzing the isomerization reaction between glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone. Several human parasites depend completely on the blood glucose of their host, using glycolysis to obtain all their energy. Therefore, TIM represents an appropriate pharmacological target to design new inhibitors that serve as drugs to eradicate these parasitic diseases. This work is intended to characterize the binding of the inhibitor 3-D-phosphoglycerate to the *Saccharomyces cerevisiae* TIM, (ScTIM), by the technique isothermal titration calorimetry, allowing us to determine the thermodynamic parameters of the binding process (ΔG , ΔH y ΔS). Since the crystallographic structure of the free enzyme and the complexes of ScTIM with the inhibitors 2-phosphoglycolate and phosphoglycolohydroxamate are known, we will obtain a model of the ScTIM-3-phosphoglycerate complex and try to correlate the thermodynamic binding parameters obtained with the interactions observed in that complex. The detailed knowledge of the inhibition process will allow the design of new inhibitors with possible pharmacological activity.

CAPITULO I.

Introducción.

1.1. Ciencia e ingeniería de materiales.

Desde los orígenes de las civilizaciones los humanos han tenido que enfrentarse a las realidades de sus entornos tanto sociales, medioambientales y climatológicas. De esto surge la necesidad de iniciar una búsqueda de probar con diversos materiales (madera, piedra, hojas de árbol, aceites naturales, pieles de animales, etc.) de sus alrededores con el fin de cubrir necesidades fundamentales como son: comida, vestimenta y armas de cacería. La manipulación de diversos materiales ha permitido lograr obras imponentes para la raza humana desde adaptación de cuevas con pinturas rupestres (manejo empírico de pigmentos naturales) hasta obras tan imponentes como una gran cantidad de pirámides construidas en la antigüedad; esta comprensión empírica que se tuvo de los materiales en diversas áreas de conocimiento (agricultura, construcción, artística, medicinal, etc.) fue de gran ayuda para la supervivencia de las civilizaciones antiguas. Muestra de esto fue la aplicación de diversas plantas medicinales, e incluso ya se aplicaban lo que se conoce hoy en día como cataplasmas que eran sustancias de consistencia blanda, medicinales antiguas, las cuales se aplican para el tratamiento de diversas enfermedades como en el caso de las congestiones bronquiales, pero especialmente eran aplicados como calmantes y antiinflamatorios (musculares), de los cuales se tiene su registro (de sus aplicaciones curativas) en los escritos de Hipócrates siglo V AC, pero que su aplicación viene desde tiempos más antiguos [1].

Los materiales han tenido un papel estratégicamente fundamental desde los inicios de la colonización del hombre en la tierra hasta nuestros días y sin lugar a dudas lo será en el futuro; tan solo basta mirar por las diferentes etapas por las que ha tenido que pasar la raza humana, la Edad de Piedra, Hierro, Bronce, la Revolución Industrial etc. Para darnos una idea de la enorme importancia que han tenido los materiales como una herramienta tecnológica con el propósito de desarrollar diversos aspectos fundamentales como lo son la subsistencia, bien estar, así como un desarrollo tecnológico y científico, con el propósito del progreso de la raza humanidad.

Desde el nacimiento de la disciplina de ciencia e ingeniería de los materiales, en 1954, por el investigador metalúrgico Morris Eugene Fine, de la Universidad de Northwestern en Chicago U.S.A. La cual fue la primera Universidad en cambiar el nombre de su carrera de metalurgia mecánica a ciencia e ingeniería de los materiales [2], esta ha demostrado ser una área de conocimiento multidisciplinaria la cual ha tenido un gran interés inicialmente en actividades tales como la metalurgia mecánica, química de polímeros, cerámicos y biomateriales. En el transcurso de las últimas cuatro décadas y debido principalmente a la demanda de materiales que cumplan en lo mejor posible su desempeño (en diferentes aplicaciones tecnológicas, como es el caso de la electrónica, medicina, industria alimentaria), entre otras por lo que la ciencia e ingeniería de materiales ha tenido que verse obligada a introducirse en estas áreas de investigación, ya que para tener una idea más clara del desempeño de algún material se debe tomar en cuenta el medio donde este va a desempeñar su función tal es el caso de los implantes dentales.



FIGURA 1.0 CRONOGRAMA DE LA IMPORTANCIA DE LOS MATERIALES EN DIVERSAS ÉPOCAS [3].

La ciencia e ingeniería de materiales se ha destacado por ser clave en el desarrollo industrial, económico y tecnológico de una nación, por lo que está siempre trabajando en la investigación y desarrollo de esta área de conocimiento multidisciplinaria es de gran importancia ya que tiene un papel siempre relevante en la vanguardia de una nación puesto que, el desarrollo económico de un país está íntimamente relacionada con su riqueza natural la cual también guarda una estrecha relación con la distribución de sus materiales naturales y artificiales [4]. De esta manera el desarrollo económico viene acompañado tanto del desarrollo cultural como tecnológico, científico, y por supuesto trae consigo el mejoramiento de las condiciones de vida de las sociedades. En la Figura 1.0 se ilustra las diferentes etapas a través del tiempo por las que han pasado el desarrollo de los materiales hasta este último siglo.

En las últimas décadas nos ha tocado ver el desarrollo a gran velocidad de la ciencia en todas sus áreas de investigación, y en lo que respecta al campo de la ciencia e ingeniería de los materiales; hemos visto cómo en los últimos años ha penetrado cada vez más en las disciplinas médico-biológicas. Tal es el caso de los biomateriales (hidroxiapatita-C, implantes óseos de TiO_2 , liberadores de fármacos, resinas de vidrio activo, proteínas sintéticas etc.) [5 y 6]. Sin lugar a duda el mejor inspirador para el desarrollo de la ciencia ha sido los procesos naturales, ya que en estos a partir de su observación y estudios se han llevado acabo los mejores inventos (dice un dicho “la naturaleza es más sabia de lo que nosotros creemos y todo parece apuntar que así lo es”), como es el caso de la holografía

inspirada en el camuflaje de varios insectos [7]. Asimismo, en el caso de los biomateriales, es necesario profundizar en los mecanismos de los procesos biológicos para mejorar su desempeño y función [8].

La ciencia e ingeniería de los materiales es la disciplina encargada de estudiar la relación que existe entre la estructura, función y las propiedades de los materiales ver (**Figura 1.1**), por ello es una parte muy esencial de otras disciplinas como se mencionó anteriormente. En la actualidad la clasificación de los materiales está dividida en cerámicos, metales, polímeros, materiales compuestos o compósitos, materiales electrónicos y biomateriales; estos últimos empiezan su auge hace ya más de cuarenta años, siendo tan comunes como piel, cerámica o cualquier otro elemento el cual tenga la capacidad de sustituir la función de algún tejido o de los órganos vivos presentes principalmente en el ser humano [9]. En otras palabras, un biomaterial se podría definir como una sustancia farmacológicamente inerte diseñada para ser implantada o incorporada dentro de un sistema vivo [10]. La ciencia de biomateriales es relevante en áreas como diagnóstico y terapia de enfermedades, implantación de dispositivos, sistemas de liberación de fármacos, bionanotecnología e ingeniería de tejidos. Así, este campo de la ciencia de los materiales involucra el conocimiento de otras disciplinas para tener un desempeño óptimo en las funciones que estos materiales lleven a cabo en determinadas condiciones del medio, por ejemplo, la hidroxiapatita presenta propiedades insuficientes para su desempeño como implante óseo [11]. El funcionamiento óptimo que presenta en los sistemas biológicos se debe en gran parte a las propiedades que le confiere la proteína de colágeno [12]. De esta manera se ve que para conseguir nuevos biomateriales que cumplan con un buen rendimiento y desempeño es necesario contemplar el gran papel involucrado de la biología de tejidos, celular, molecular. Ésta última ha tenido un papel muy relevante en el área de materia blanda, ya que, constituye un campo interdisciplinario y de rápida expansión.

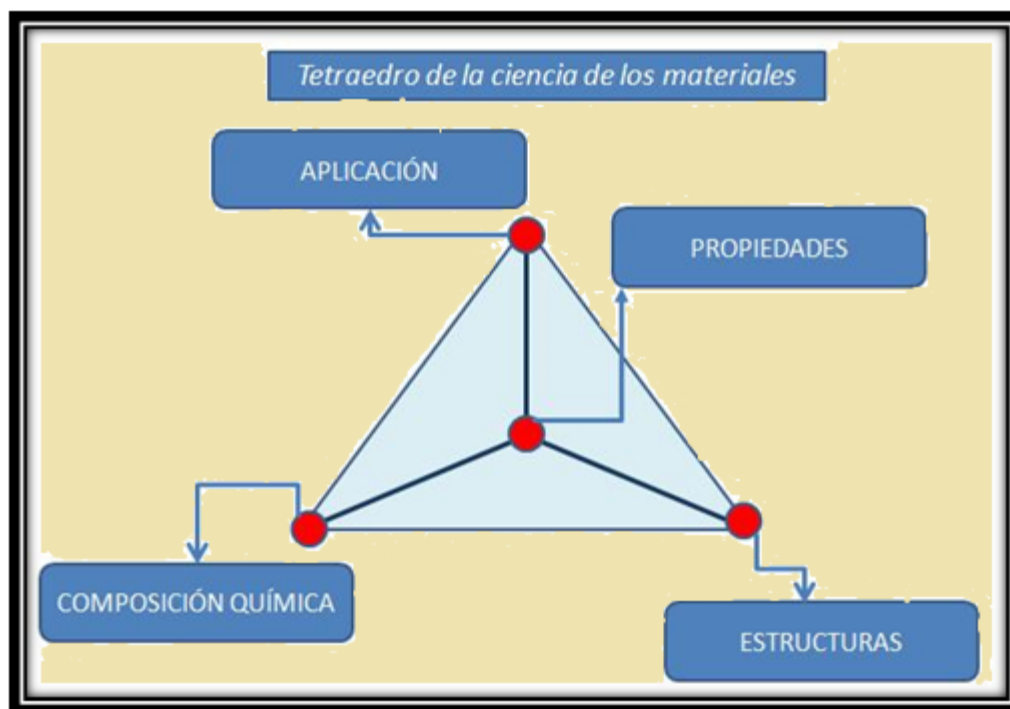


FIGURA 1.1 TETRAEDRO DE LA CIENCIA DE LOS MATERIALES [13].

Debido a que los materiales blandos se encuentran a menudo en el centro de las tecnologías modernas, la ciencia que los estudia tiene implicaciones y aplicaciones en muchas áreas que van desde la biología hasta la ingeniería electrónica. Algunos temas importantes incluyen: polímeros, biomacromoléculas, coloides, membranas, cristales líquidos, fluidos complejos, tenso activos, geles, autoensamblado molecular, reconocimiento molecular, vidrios suaves y espumas [14].

1.2. Materiales blandos.

Como se mencionó anteriormente el gran avance del área de la ciencia de los materiales en las últimas décadas ha sido sorprendente, debido a la gran versatilidad que presenta esta disciplina científica que ha logrado un gran impacto en otras disciplinas como: medicina, ingeniería electrónica, ingeniería ambiental, ingeniería aeronáutica, ingeniería de tejidos, etc., convirtiéndose en la área de investigación multidisciplinaria por excelencia.

En el año de 1991 el físico francés Pierre-Gilles recibió el Premio Nobel en Física por los estudios que realizó en diversos campos tales como polímeros, espumas, cristales líquidos, proteínas, ADN y diversos materiales biológicos[15], en sus investigaciones realizadas en estos campos, él muestra grandes semejanzas y relaciones tanto matemáticas como físicas(magnetismo, superconductividad), entre ellos, tales como ocurre en las transiciones de fase; precisamente Gilles en la ceremonia del 9 de diciembre, en el discurso que dio en Estocolmo Suecia define a los materiales blandos como materiales que cuentan con características de flexibilidad y complejidad [16]. Sirviendo esto como parte aguas en el desarrollo de las investigaciones de esta parte de la ciencia de los materiales.

Respecto al estudio de la materia blanda hay que mencionar que está es un subcampo de la materia condensada (materia blanda condensada) [17], el estudio de la materia blanda precisamente emerge de la complejidad, sofisticación, así como el autoensamblado molecular que presentan estos materiales [18]. Cabe mencionar el gran impacto que han tenido los estudios de estos materiales en el área de ciencia de los materiales alrededor del mundo que, en estas últimas décadas diversas universidades han incorporado el estudio de la materia blanda dentro de sus espacios de investigación, universidades tales como Purdue University U.S.A., Harvard University U.S.A., el International Institute for Complex Adaptive Matter, U.S.A, International Research Staff Exchange Scheme, de la Unión Europea, la Escuela Politécnica Federal de Zúrich en Suiza, etc. Algo que también refleja cómo la materia blanda va ganando terreno en el campo de la ciencia e ingeniería de materiales, es la aparición de revistas como *Journal of Soft Materials*, la cual inicia su actividad en el año del 2002 y cuyo principal objetivo es reportar los avances de investigación de materia blanda [19].

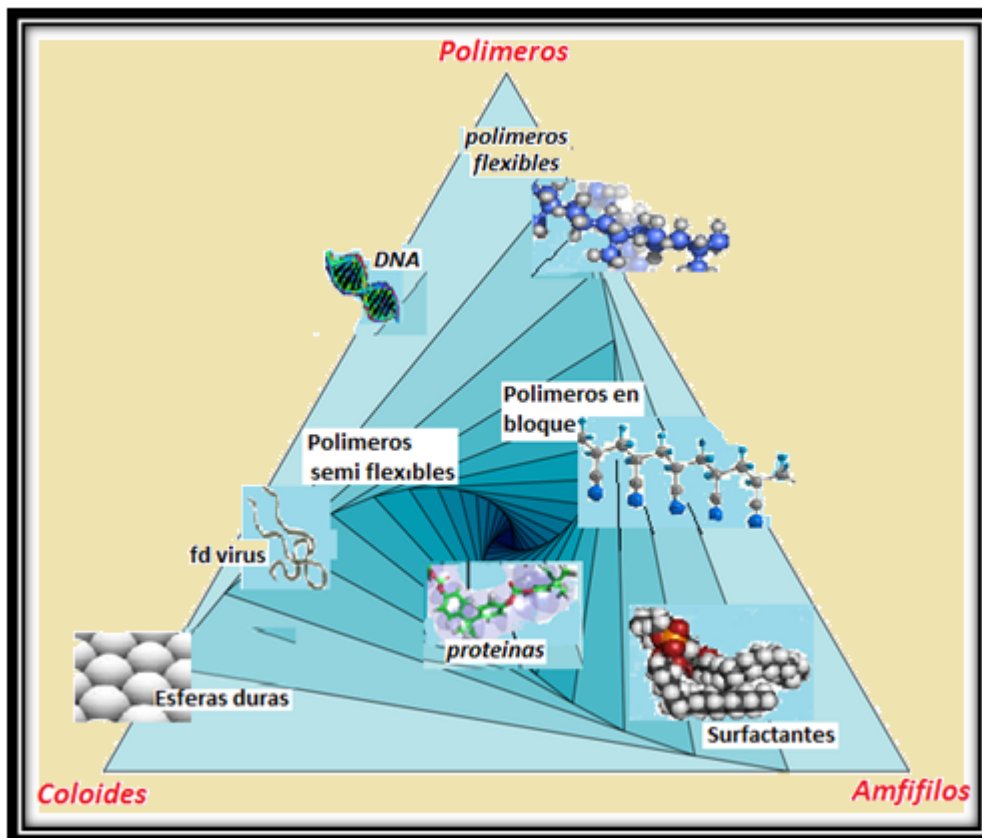


FIGURA 1.2 PIRÁMIDE DE LOS MATERIALES BLANDOS [20]

En el año del 2016 los investigadores D. Schlüter y J. Vermant, de la universidad de Zürich realizaron una clasificación de los materiales blandos, llamando a esta clasificación como triángulo de los materiales blandos ver figura 1.2. Las investigaciones en el Laboratorio de Materia Blanda se centran en un enfoque multidisciplinario incorporando elementos de la química orgánica, la ciencia de la biología molecular, la biofísica, la ciencia de materiales y la fisicoquímica. Las principales áreas de investigación del laboratorio son: ensamblado supramolecular, nanotecnología con materia blanda, reconocimiento molecular, diseño de materiales macromoleculares “activos”, ensamblado dirigido por reconocimiento molecular y arquitecturas macromoleculares interfaciales [21].

Cabe destacar que el tema de estudio de nuestro interés es el reconocimiento molecular de inhibidores, o lo que se conoce como interacción proteína-inhibidor.

1.3. Reconocimiento molecular.

El reconocimiento molecular se podría definir como la unión de moléculas específicas hacia un receptor molecular identificado. Asimismo, las investigaciones que abrieron camino al reconocimiento molecular inician desde el descubrimiento de las ciclodextrinas en 1891 por Villers y Hebd, así mismo el concepto llave-cerradura introducido por Emil Fisher en 1894 se podría decir que son los eventos que marcaron los inicios del nacimiento de la química supramolecular; la cual también es conocida como la química del ensamblaje molecular [22]

y está basada principalmente en los mecanismos de la química orgánica e inorgánica sintética. Su estudio está inspirado por la biología ya que los sistemas biológicos involucran un gran número de moléculas que se unen para formar estructuras complejas tales como micelas, bicapas lipídicas, así como complejos enzimáticos. Las definiciones siguientes fueron expuestas en la década de los años 60 por Jean Marie Lehn: "La química supramolecular es la química de los enlaces intermoleculares, cubriendo las estructuras y las funciones de las entidades formadas por asociaciones de dos o más especies", y Fritz Vögtle: "La química supramolecular se define como la química de interacciones intermoleculares diseñadas" [23,24].

Los mecanismos del reconocimiento molecular son fundamentales ya que través de ellos las enzimas actúan sobre sus respectivos sustratos, o el sistema inmune identifica a los microorganismos invasores [25].

Investigaciones multidisciplinarias en relación al reconocimiento molecular y la ciencia de los materiales han sido vanguardistas e innovadoras en diferentes disciplinas. Por ejemplo, en medicina con el descubrimiento del cisplatino; o cis-diaminodicloroplatino Figura (1.3), el cual es un medicamento basado en el platino usado en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como en el cáncer de ovario y en el cáncer de pulmón de células pequeñas (carcinoma microcítico de pulmón). Otros complejos basados en el platino para el tratamiento de cáncer son el oxaliplatino y carboplatino, la formación de estos complejos viene dada por un ion, o átomo central, y ligandos que se unen por medio de enlaces covalentes coordinados [26].

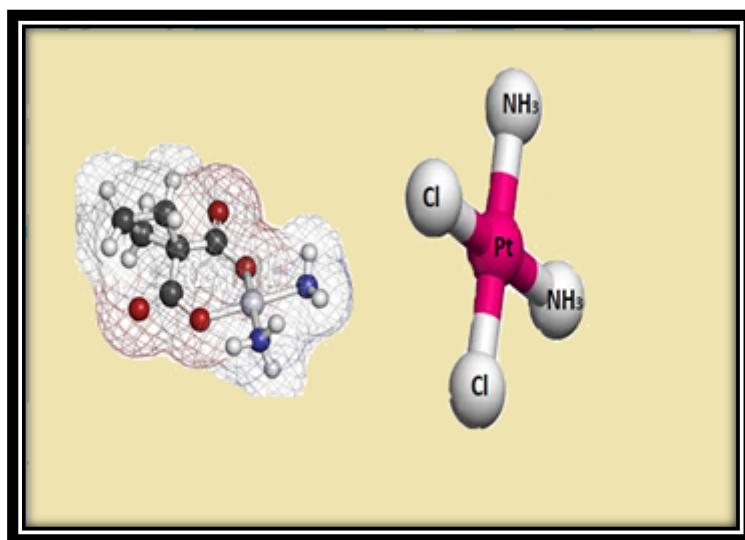


FIGURA 1.3 MOLÉCULAS TERAPÉUTICAS CONTRA EL CÁNCER [27].

Como se mencionó anteriormente en diversos campos los investigadores buscan cada vez más imitar a la naturaleza con el fin de entender lo que ocurre en estos, parte del reconocimiento molecular y de la química es imitar los procesos biológicos. En el mecanismo de unión por el cual se llevan a cabo los procesos enzimáticos, se aceptan dos propuestas: una por bioquímico Daniel E. Koshland conocido como ajuste inducido, en el que la enzima

va modificando su forma con el propósito de unirse al sustrato [28], el otro mecanismo es conocido como preorganización y en este la enzima no sufre grandes cambios conformacionales por lo que en términos energéticos es mucho más favorecido.

1.4. Interacciones proteína inhibidor.

La manera en cómo se asocian una molécula anfitrión y su huésped (términos usados en química supramolecular) está determinada por la especificidad; la cual está estrechamente relacionada con dos factores importantes: primeramente los sitios de unión tanto del anfitrión como del huésped deberán tener una correspondencia en sus interacciones no covalentes y lo segundo a considerar es el ajuste geométrico que debe existir entre el anfitrión y el huésped. En este sentido, en los procesos biomoleculares las interacciones electrostáticas generalmente tienen un papel muy importante en el reconocimiento molecular y muy particularmente el caso de la unión de inhibidores, o sustratos, dirigidos a macromoléculas (proteína-inhibidor o proteína-proteína).

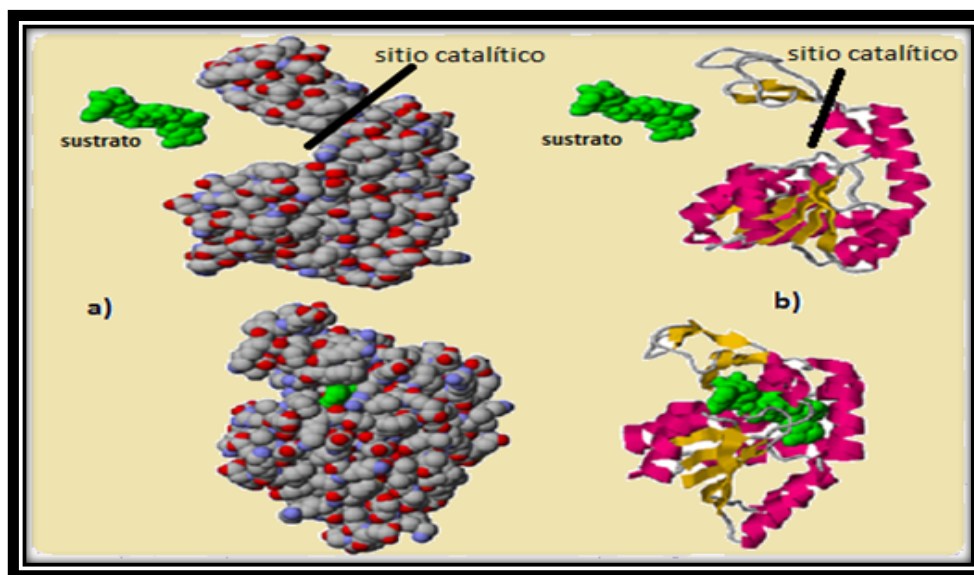


FIGURA 1.4 SE MUESTRA LA INTERACCIÓN PROTEÍNA (ADENILATO QUINASA DE *E. COLI*)-INHIBIDOR AP5A(DI ADENOSIN PENTAFOSFATO) A) REPRESENTACIÓN CON TODOS LOS ÁTOMOS, B) REPRESENTACIÓN MOSTRANDO LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE LA PROTEÍNA [29].

Las fuerzas que se presentan en la unión de proteína-inhibidor, son las que ocasionan que un sustrato se una al sitio catalítico tal como se muestra en la (figura 1.4), y éstas son interacciones no covalentes tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas e interacciones de Van der Waals (**Figura 1.5**).

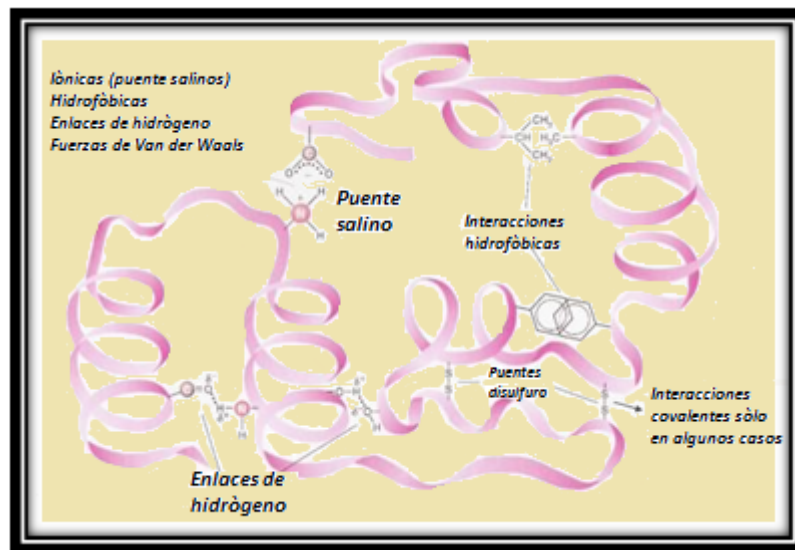


FIGURA 1.5 SE MUESTRAN LAS DIFERENTES INTERACCIONES PRESENTES EN LAS BIOMACROMOLÉCULAS[29].

A continuación, se describen brevemente cada una de ellas:

- a) **Puentes de hidrógeno:** Diversos autores han considerado a este tipo de interacciones como electrostáticas ya que por medio de ellas se explica la relación que hay entre la fuerza de enlace y su geometría, las fuerzas de interacción entre este tipo de enlaces van desde los 4 hasta los 21 kJ/mol. Estas interacciones se caracterizan por ocurrir entre especies donadoras, las cuales son parcialmente negativas y especies aceptores de un protón, además del hidrógeno que se localiza entre ellas como se aprecia en la (figura 1.6).

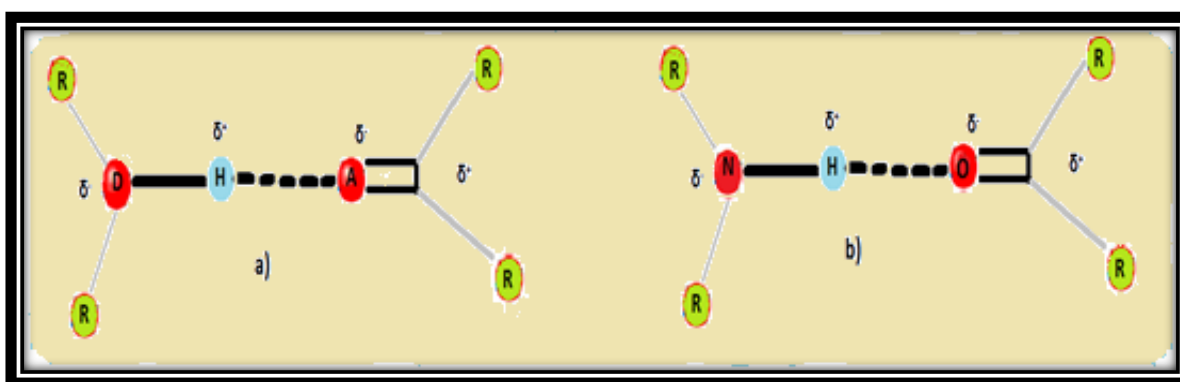


FIGURA 1.6 A) REPRESENTACIÓN CLÁSICA DEL PUENTE DE HIDRÓGENO. B) PUENTE DE HIDRÓGENO ESTABLECIDO ENTRE UN GRUPO CARBONILO (ACEPTOR) Y UN GRUPO AMINO (DONADOR) [30].

La fuerza de enlace guarda una relación con la acidez del donador y la basicidad del aceptor. En los inicios del estudio de este tipo de interacciones se consideraron que sólo ocurrían entre sistemas ($\text{O}-\text{H}-\text{O}$, $\text{N}-\text{O}$ y $\text{F}-\text{H}-\text{F}$) pero a finales del siglo pasado, en la década de los años noventa la definición se extendió a ($\text{C}-\text{H}-\text{O}$ y $\text{C}-\text{H}-\pi$) los cuales son considerados como enlaces no convencionales y que cuya característica sólo difiere en la especie aceptor la cual

puede tener ya sea un par de electrones en el enlace σ , o un par de electrones de un metal de transición. El estudio de este tipo de enlaces en química supramolecular los hace importantes ya que son considerados como los formadores de ensamblajes altamente organizados, así como por su estabilidad atribuida a su selectividad y direccionalidad [31].

- b) Interacciones de Van der Waals:** Este tipo de interacciones tiene un rol especial en los sistemas anfitrión-huésped, ya que ellas están implicadas en las asociaciones que ocurren entre los dipolos originados por dos especies cercanas en función de las variaciones en la distribución de sus electrones. Este tipo de interacciones fueron detectadas en 1873 por vez primera por Johannes Diderik van der Waals, en la figura 1.7 se muestra un esquema de este tipo de interacción. Una característica de este tipo de enlaces es la polarización que ocurre en las moléculas que participan en esta interacción, ya que estas aumentan fuertemente en relación a su polarización. En este tipo de interacciones se presenta lo que se conoce como interacción de Debye, la cual se presenta cuando una molécula que tiene un dipolo permanente puede inferir en otro dipolo de una molécula cercana. Otro tipo de interacciones presentes son las conocidas como interacciones de Keesom las cuales forman dipolos atractivos, este fenómeno se presenta cuando moléculas que interaccionan a determinada distancia contienen dipolos constantes, así como orientados. El tercer tipo de interacciones que se presenta en este tipo de enlaces son las conocidas como interacciones de London las cuales se hacen presentes entre dos moléculas, no polares pero que son mutuamente polarizables [32].

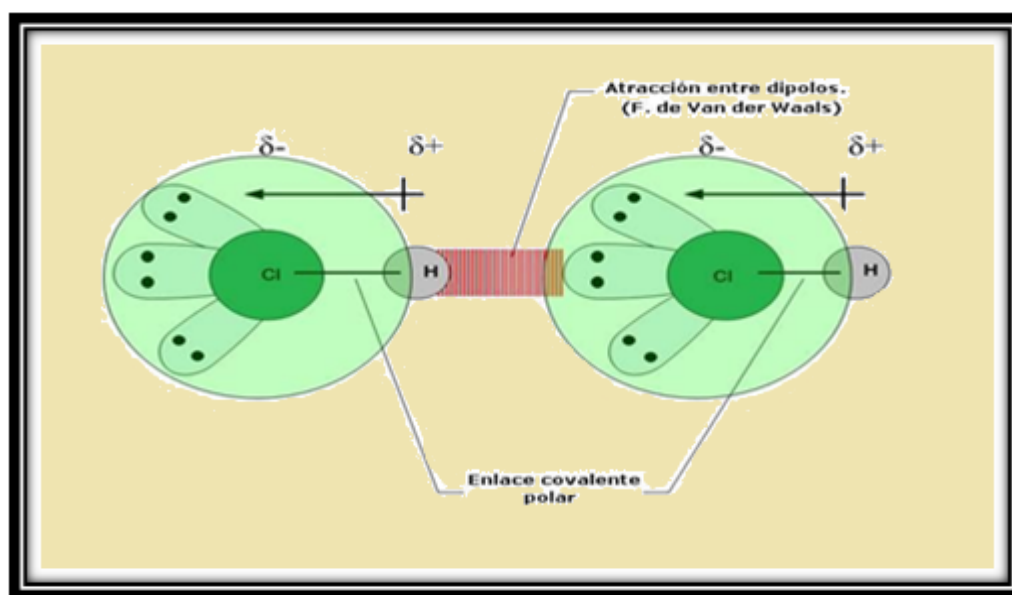


FIGURA 1.7. REPRESENTACIÓN DE LA INTERACCIÓN VAN DER WAALS. EN UNA MUESTRA DE UN COMPUESTO HAY UN GRAN NÚMERO DE MOLÉCULAS LAS CUALES GIRAN HASTA SITUARSE DE FORMA QUE LAS FUERZAS ATRACTIVAS PREDOMINEN SOBRE LAS REPULSIVAS [33.]

- c) **Interacciones electrostáticas:** El fundamento teórico de estas interacciones es la ley de Coulomb. Estas interacciones están en relación del inverso de la distancia entre ellas, incluyen las interacciones dipolo-dipolo, dipolo-ion e ion-ion. La interacción entre dos especies es calculada por la suma de sus cargas puntuales empleando la ecuación de Coulomb [34], como se aprecia en la figura 1.8.

Las interacciones electrostáticas tienen gran importancia en los sistemas biológicos ya que son detectadas en el reconocimiento de las enzimas por sus respectivos sustratos.

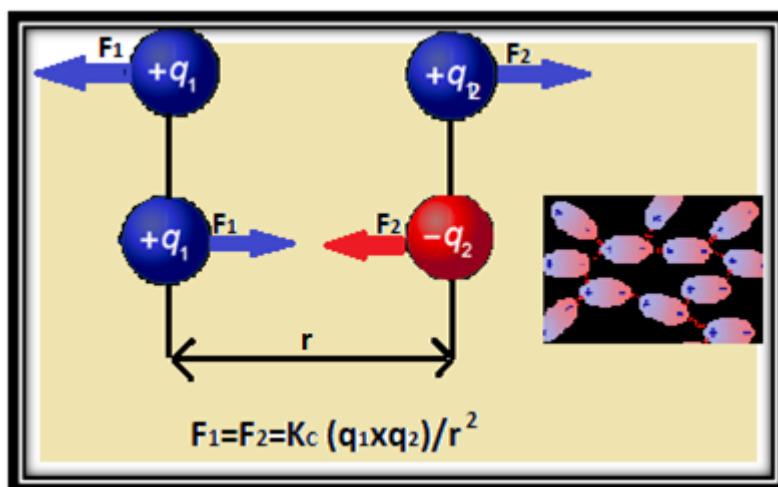


FIGURA 1.8 INTERACCIÓN ELECTROSTÁTICAS, DE LA ECUACIÓN DE COULOMB SE APRECIA QUE LA FUERZA ES DIRECTAMENTE PROPORCIONAL AL CUADRADO DE LA DISTANCIA ENTRE CARGAS [35].

- d) **Interacciones hidrofóbicas:** El origen de este tipo de interacciones tiene su explicación desde la teoría clásica propuesta por Frank-Evans en la cual nos hablan de una disminución o pérdida en el movimiento de las moléculas de agua cuando se lleva a cabo una solvatación de solutos no polares. La orientación de moléculas de agua: por medio de la superficie de un soluto el cual tiene un determinado ordenamiento de red de moléculas las cuales retienen o atrapan a otro tipo de moléculas en estructuras tipo clatrato (figura 1.9) [36],

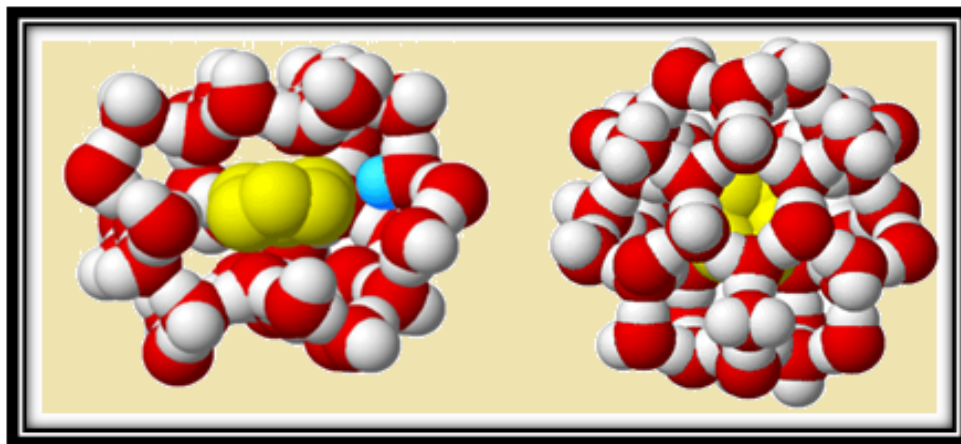


FIGURA 1.9. ESTRUCTURAS LAS CUALES TIENEN LA CAPACIDAD DE RETENER MOLÉCULAS LLAMADAS ESTRUCTURAS TIPO CLATRATO [36].

esto es con el propósito de mantener un gran número de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua, lo cual tendrá como consecuencia que gran parte de las moléculas de agua tengan una ganancia de entalpia y una disminución en su entropía, ocasionada por la ordenada formación de estas estructuras en el disolvente. En las últimas décadas se ha tratado de dar una explicación de este tipo de interacciones, recurriendo siempre a aspectos termodinámicos para su entendimiento.

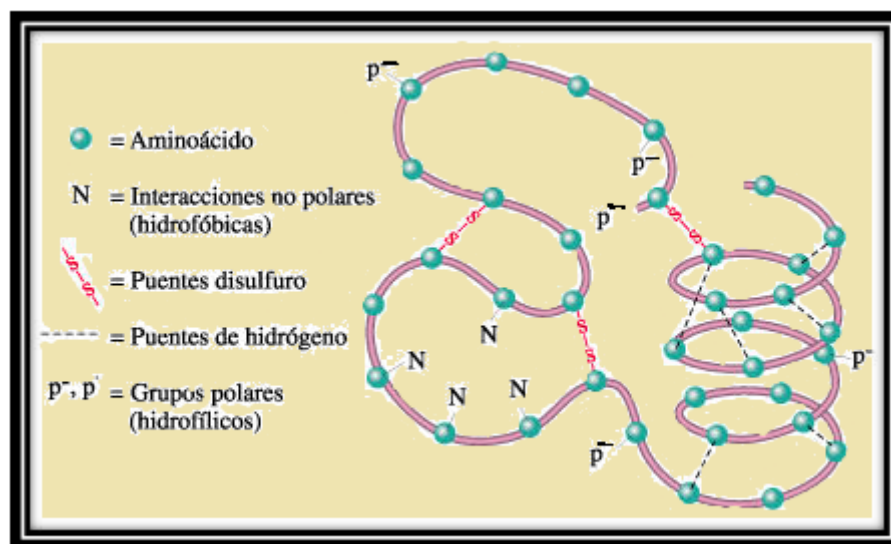


FIGURA 1.10 INTERACCIÓN HIDROFÓBICAS [37].

El agua tiene un papel importante en aspectos biológicos como solvente ya que esta se encarga de disolver una importante cantidad de moléculas desde azúcares, sales, micelas, hasta moléculas de gran peso molecular tales como ácidos nucleicos, proteínas. Tanto los iones como los aminoácidos polares tienen alta solubilidad en agua por lo que se les conoce como hidrofílicos y a las moléculas de baja solubilidad se les denomina hidrofóbicos, como algunos aminoácidos no polares (alifáticos y

aromáticos). En las proteínas los grupos no polares por lo regular se encuentran inmersos en el interior de la macromolécula (ver figura 1.10), estos grupos tienden a segregarse de las moléculas de agua [38].

1.5. Termodinámica del reconocimiento molecular proteína-inhibidor.

Los procesos celulares en su mayoría son controlados por proteínas, como la catálisis enzimática que permite que la vida ocurra en la escala de tiempo adecuada, o como en la expresión o represión de genes que está modulada por interacciones de proteínas que se unen a regiones específicas del ADN y cuyo conocimiento es crucial para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas o farmacológicas. El avance en el desarrollo de estos procesos depende de la comprensión de las interacciones moleculares entre las proteínas y sus respectivos ligandos [39].

Las fuerzas que estabilizan a las proteínas en su conformación nativa, esto es en su estado biológicamente activo, son interacciones de tipo no covalente: puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas; que son las mismas que se presentan en la interacción proteína ligando (P-L). La forma de cuantificar la afinidad debido a dichas interacciones es mediante la determinación de la constante de unión (K_U) o bien su constante recíproca conocida como constante de disociación ($K_d = 1/K_U$) [40], para esto es necesario que existan condiciones de equilibrio termodinámico:



De esta manera la constante de unión (K_U) quedará definida por la relación que existe entre la concentración de la proteína (P) y ligando (L) libres, y el complejo formado (PL) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$K_U = [PL] / [P] [L] \quad \text{Ec. 1.1}$$

La K_U está relacionada con la energía de interacción, de la ecuación anterior se ve que, si el valor de K_U es grande la afinidad será más alta. Por otro lado, la energía libre de Gibbs se relaciona con la K_U , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta G_U = - RT \ln K_U \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde T es la temperatura absoluta y R la constante universal de los gases.

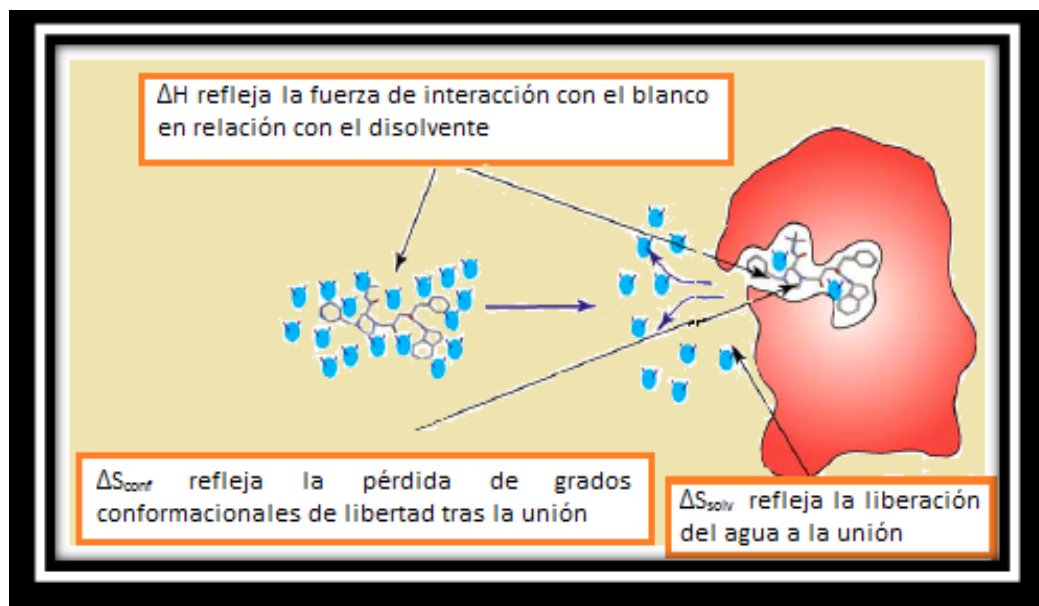


FIGURA 1.11. LA AFINIDAD DE UNIÓN DE UNA MOLÉCULA PEQUEÑA A SU BLANCO PROTEICO (ROJO) ES DETERMINADO POR EL BALANCE DE LA MAGNITUD DE SUS INTERACCIONES CON EL BLANCO Y ÉSTOS CON EL SOLVENTE ACUOSO. LA CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA ES LA ÚNICA TÉCNICA QUE MIDE DIRECTAMENTE LA MAGNITUD DE LAS FUERZAS DE ENLACE. LOS PARÁMETROS MÁS IMPORTANTES DE ENLACE QUE PUEDEN SER CONTROLADOS, PARA EL DESARROLLO DE FÁRMACOS SON LA ENTALPIA, LA ENTROPÍA DE SOLVATACIÓN ΔS_{solv} Y LA ENTROPÍA DE CONFORMACIÓN DE LOS CAMBIOS (ΔS_{conf}). [41].

La energía libre de interacción se puede dividir en sus dos componentes, el entálpico y el entrópico como se ve en la ecuación:

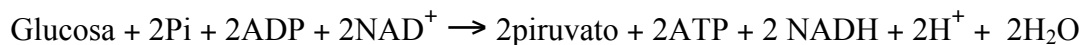
$$\Delta G_U = \Delta H_U - T \Delta S_U \quad \text{Ec. 1.3}$$

Las contribuciones entrópicas (ver figura 1.11) corresponden a cambios que ocurren en los grados de libertad no sólo del ligando y la proteína, sino también de las moléculas de agua que hidratan estas especies.

1.6. Triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

La triosafosfato isomerasa es una enzima homodimérica (figura 1.12) con 247 residuos de aminoácido en cada una de sus subunidades [42], en la tabla 1.0 se presentan algunas de sus propiedades más importantes. En el presente trabajo se utilizó la triosafosfato isomerasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM). Esta es una enzima que junto con otras nueve enzimas son las encargadas de realizar la glucólisis (figura 1.13), así como participar en la gluconeogénesis y en la síntesis de los triglicéridos.

La glucólisis es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa y así obtener energía para la célula [43]. La glucólisis se lleva a cabo en todas las células del organismo, específicamente se produce en el citosol celular y esta comprende la conversión de glucosa en piruvato, esta se puede ver en la siguiente reacción global:



Este proceso involucra 10 diferentes enzimas (figura 1.13), las cuales catalizan a su vez diez reacciones consecutivas, estas se pueden dividir básicamente en tres etapas:

- 1) Formación de fructuosa 1,6-bisfosfato a partir de glucosa.
- 2) Formación de triosas fosfato (gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato) a partir de fructuosa 1,6-bisfosfato.
- 3) Formación de piruvato a partir de gliceraldehído 3-fosfato.

Esta enzima cataliza la isomerización entre el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), a través de un intermediario cis-enodiol (figura 1.14). Esta reacción se lleva a cabo con una alta eficiencia ya que la velocidad de isomerización está controlada sólo por la difusión de los sustratos [44]; es por ello que se dice que la TIM es una enzima casi perfecta [45]. La importancia biológica de esta enzima es evitar la acumulación de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) que se descompone en metilglioxal que es tóxico [46].

Punto isoelectrico	pI= 5.6
Masa molecular	PW== 26.65 KDa
Número de residuos	247
Coefficiente de extinción	$\epsilon = 2.67 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Rutas metabólicas en las que participa	Ruta de la glucólisis, gluconeogénesis, ciclo de Krebs
Velocidad de isomerización	$V = 10^8 - 10^{10} \text{ M s}^{-1}$
Estructura cristalográfica PDB	1YPI tipo barril (α/β)

TABLA 1. O PROPIEDADES DE LA TIM.

Debido a la importancia en la ruta glucolítica de la TIM y a que en la actualidad hay varias patologías parasitarias sin un tratamiento efectivo, esta enzima es considerada como un blanco farmacológico en los parásitos que tienen la capacidad de hospedarse en la sangre de los mamíferos, alimentándose de la glucosa contenida en ella. Puesto que el bloqueo de una enzima puede matar a un organismo patógeno o corregir un desequilibrio metabólico, muchos medicamentos en la actualidad actúan como inhibidores enzimáticos. De ahí la importancia de detener la actividad catalítica de esta enzima TIM en los parásitos que afectan la salud del humano. Ejemplos de enfermedades que causan este tipo de parásitos son la malaria y las tripanosomiasis (enfermedad del sueño y el mal de Chagas) [47] esta última se presenta en el sureste de nuestro país y hasta el día de hoy no se ha encontrado cura para este padecimiento que llegar a causar la muerte.

En últimos reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 3.2 mil millones de personas en 97 países, están en riesgo de sufrir una infección. El continente que tiene la mayor morbilidad y mortalidad es África, en donde se presentan alrededor del 90% (306 000 muertes/año) de todas las muertes debidas por estos parásitos [48]. En la región de América, se tienen reportes de reducciones en la incidencia de >75% en 13 de los 21 países en los que persiste la transmisión [49]. En México los cuatro focos de transmisión persistentes de mayor importancia se encuentran en Chiapas (frontera con Guatemala) y en el sur de Oaxaca, en el noreste del país en el límite de Durango y Nayarit, en el año 2013, México reportó 499 casos [50].

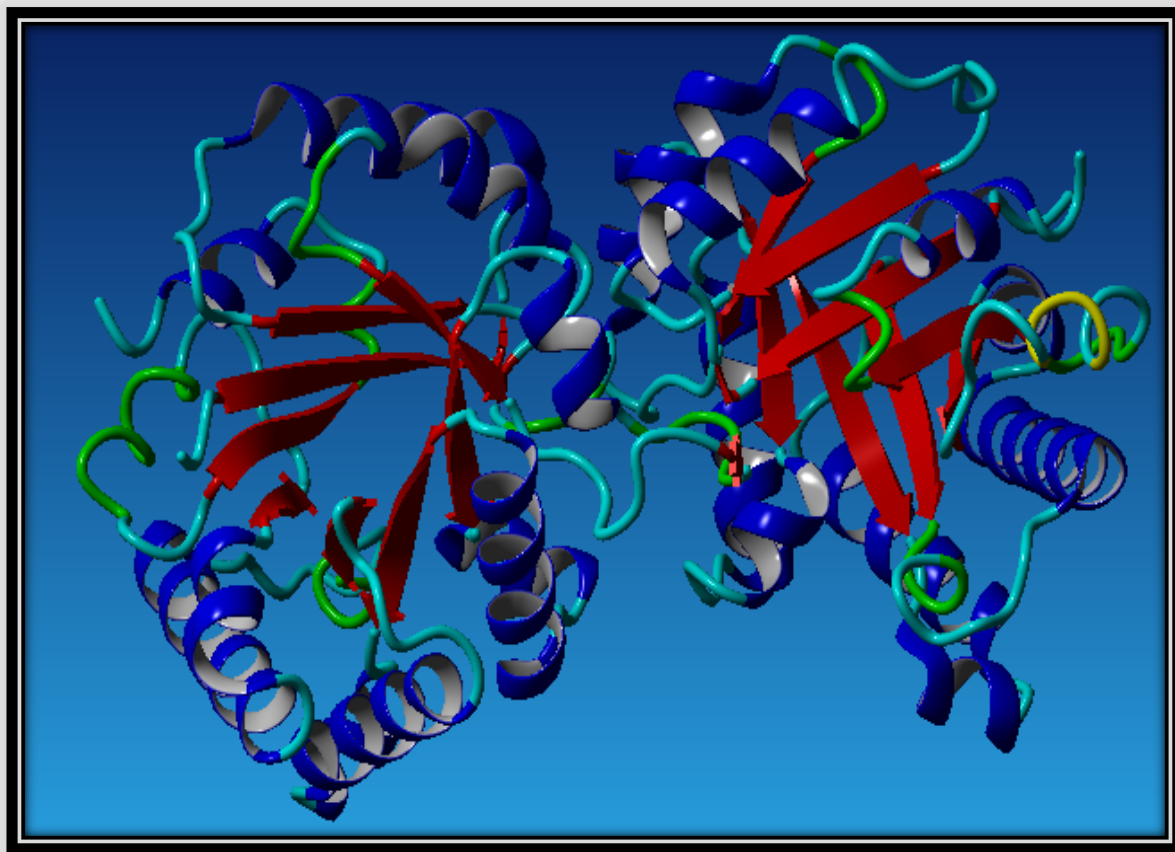


FIGURA 1.12. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA *ScTIM* EN AUSENCIA DE INHIBIDOR. SE MUESTRAN LAS HEBRAS α PARALELAS (ROJO), LAS HÉLICES (BLANCO) QUE RODEAN AL BARRIL DE HEBRAS β . SE UTILIZÓ EL PROGRAMA YASARA PARA VISUALIZAR LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL.

Uno de los aspectos más estudiados de la *ScTIM* ha sido su comportamiento catalítico, pues como se mencionó, es considerada una casi “enzima perfecta”; la variación de la actividad catalítica de esta enzima con la concentración de sustrato muestra un comportamiento tipo Michaelis–Menten. Se sabe que la *ScTIM* presenta actividad únicamente como dímero [51].

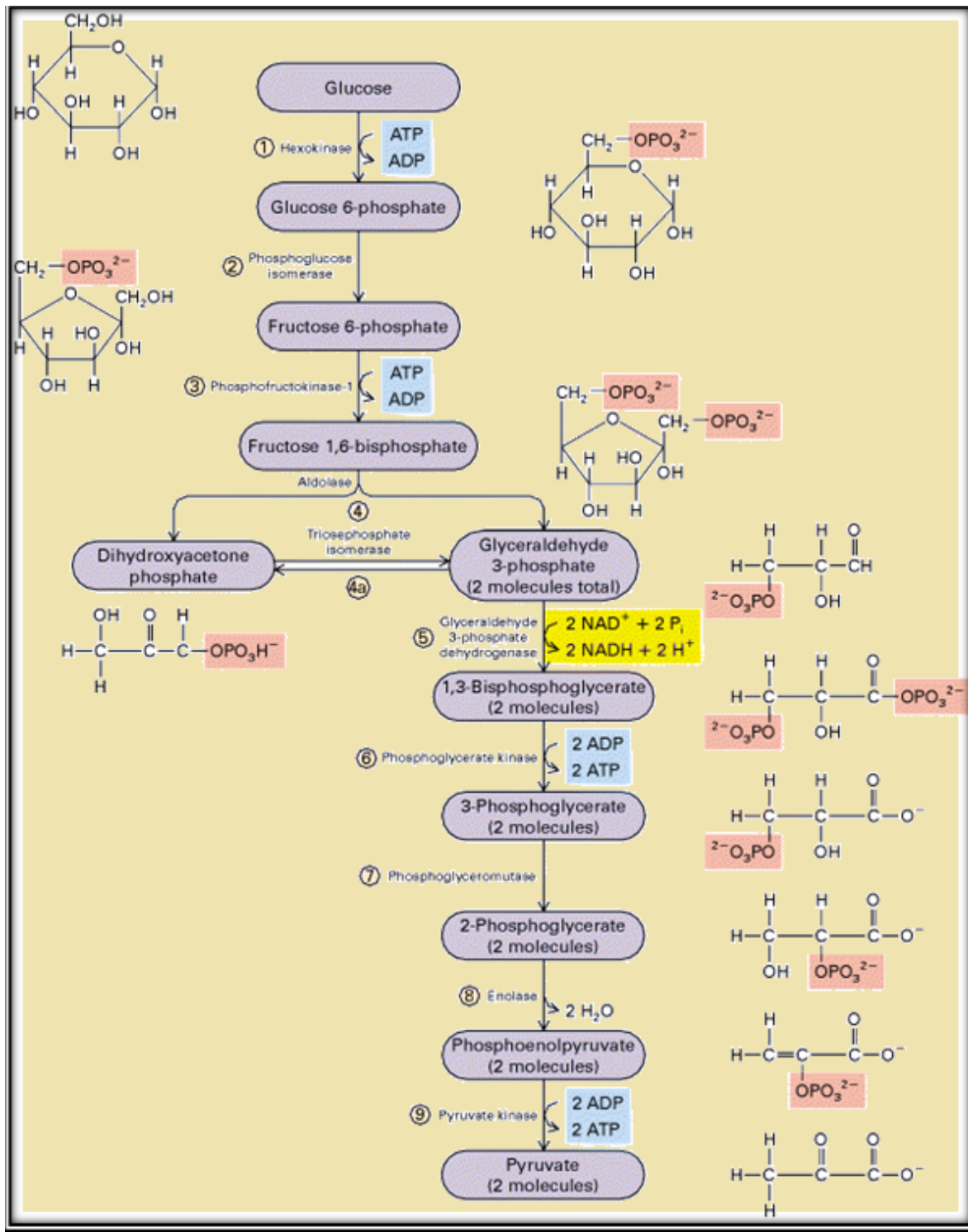


FIGURA 1.13. LA VÍA DE LA GLUCÓLISIS. ESQUEMA DE LAS 10 ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA GLUCÓLISIS: 1) HEXOQUINASA, 2) FOSFOGLUCOSA ISOMERASA, 3) FOSFOFRUCTOQUINASA, 4) ALDOSA, 5) TRIOSAFOSFATO ISOMERASA, 6) GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA, 7) FOSFOGLICERATO CINASA, 8) FOSFOGLICERATO MUTASA, 9) ENOLASA Y 10) PIRUVATO CINASA.

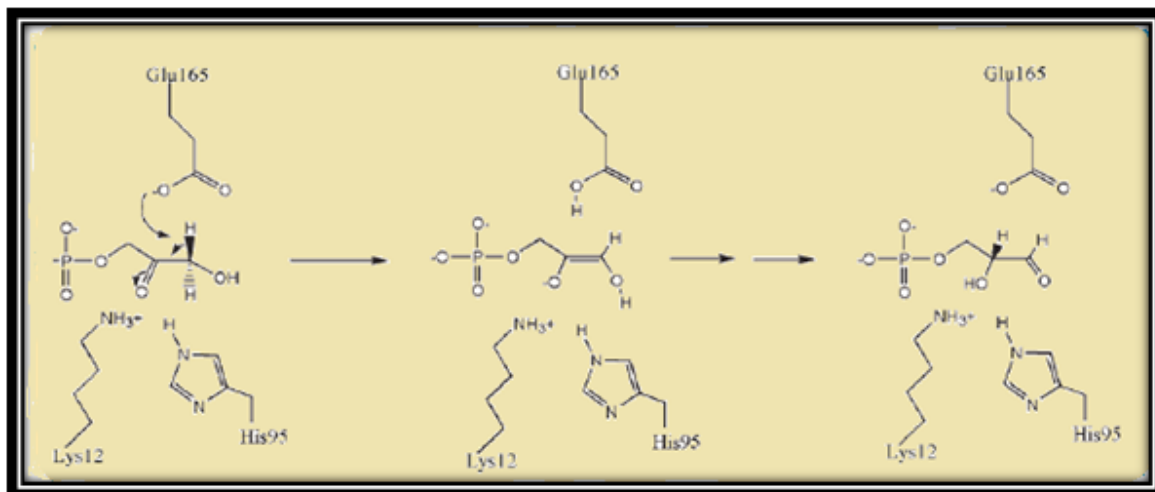


FIGURA 1.14. REACCIÓN CATALIZADA POR LA ScTIM. LA DHAP SUSTRAE UN PROTÓN AL GLU165 DE LA ENZIMA PERMITIENDO LA FORMACIÓN DE UN INTERMEDIARIO ENODIOL/ENODIOLATO. LA HIS 95 DE LA ENZIMA ACTÚA COMO UN DONADOR DE PROTONES [52].

Actualmente se han reportado las estructuras cristalográficas de la TIM de varias especies tales como: *Trypanosoma brucei* [53], *Escherichia coli* [54], *Saccharomyces cerevisiae* [55], *Gallus gallus* [56], *Homo sapiens* [57], *Trypanosoma cruzi* [58], *Vibrio marinus* [59], *Pyrococcus woesei* [60], *Caenorhabditis elegans* [61], *Leishmania mexicana* [62], *Thermotoga maritima* [63], *Plasmodium falciparum* [64], sólo por mencionar algunas. A través de estudios de difracción de rayos X, así como otros de resonancia nuclear magnética, se ha demostrado que el sitio catalítico se localiza en el centro del barril de hojas β que existe en cada monómero. Dicho sitio está conformado por tres residuos de aminoácidos que están involucrados directamente en la reacción catalítica: Glu165, His95 y Lys12 (figura 1.15).

El Glu165 se ha identificado como la base catalítica y es el responsable de sustraer un protón del C1 de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) para producir gliceraldehído 3-fosfato (G3P), ó del protón del C2 del G3P para producir DHAP, iniciando de esta forma la catálisis. La His95 participa en la transferencia de un protón y la Lys12 tiene la función de producir un ambiente cargado positivamente con el fin de atraer al sustrato que tiene una carga negativa en dirección al sitio activo.

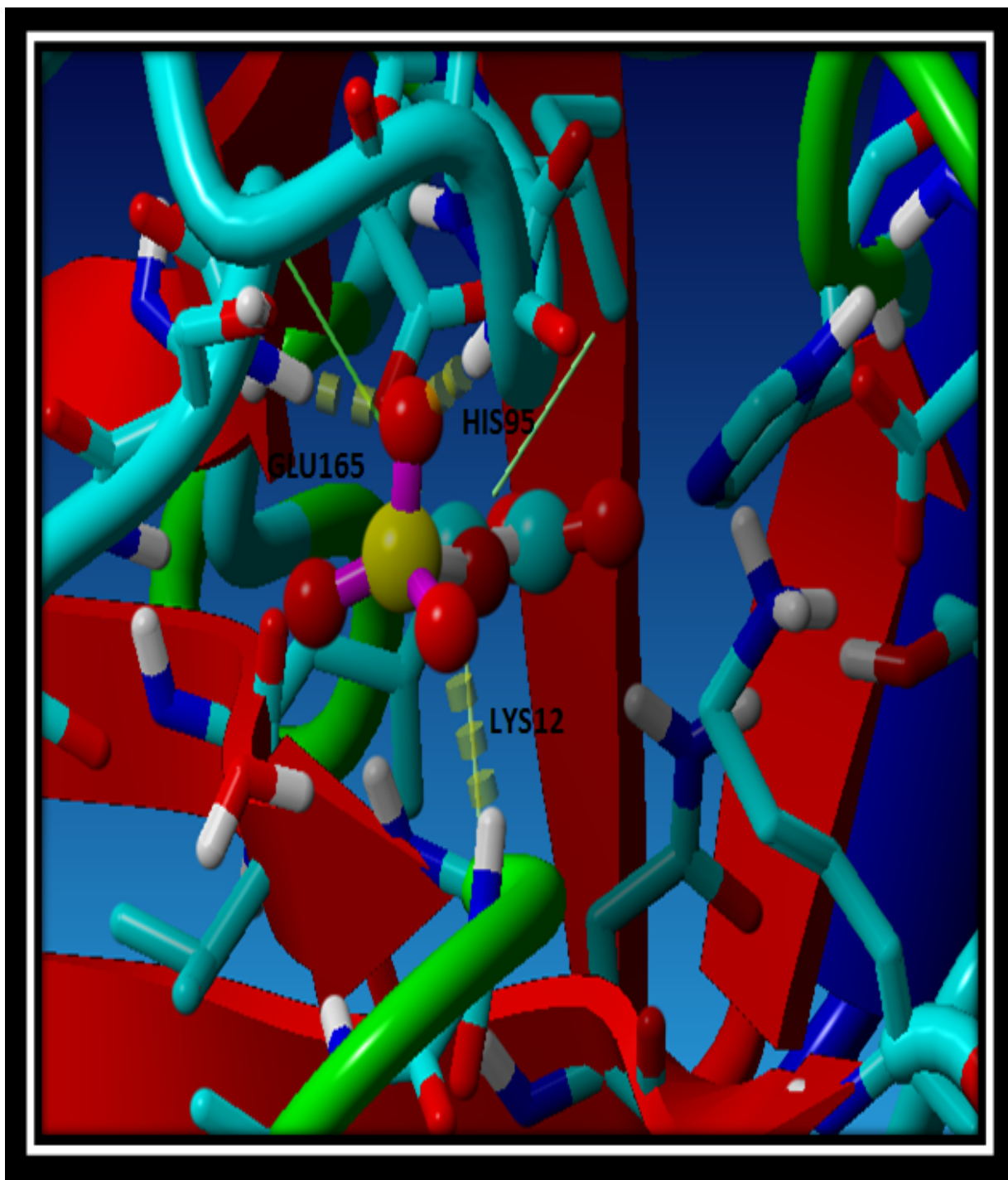


FIGURA 1.15. ESTRUCTURA TRIDIMENCIONAL DE UNA DE LAS SUBUNIDADES DE LA SctIM CON CÓDIGO PDB- 2YPI. SE DESTACAN LOS TRES RESIDUOS CATALÍTICOS (GLU165, HIS 95 Y LYS 12). LOS CUALES INTERACTÚAN CON EL SUSTRATO 2-FOSFOGLICOLATO, SE UTILIZÓ EL PROGRAMA YASARA PARA CREAR LA VISUALIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENCIONAL [65].

1.7. Inhibidores de la ScTIM.

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se adhieren a las enzimas ocasionando una disminución en su actividad, por lo que uno de los intereses por estudiar la inhibición de enzimática, es su aplicación en farmacología ya que como se mencionó muchos medicamentos en la actualidad actúan como inhibidores enzimáticos [66]. Por otro lado, los inhibidores nos dan información sobre el comportamiento de los mecanismos de reacción de la enzima a estudiar. Por lo que resulta de gran interés su estudio. Con respecto a la inhibición de la ScTIM, se han realizado diversos trabajos los cuales muestran el mecanismo de reacción de la ScTIM por lo que no hay evidencia de que exista algún tipo de cooperatividad catalítica entre las dos subunidades de la TIM, más sin embargo se sabe que esta solo es activa cuando está presente como dímero [67].

En nuestro grupo de trabajo, se han cuantificado las propiedades termodinámicas (K_u , ΔH_u , ΔS_u y ΔC_p) de dos de sus inhibidores fosforilados más afines de esta enzima el (PGH) y (2PG) los cuales se aprecian en la siguiente figura (1.16).

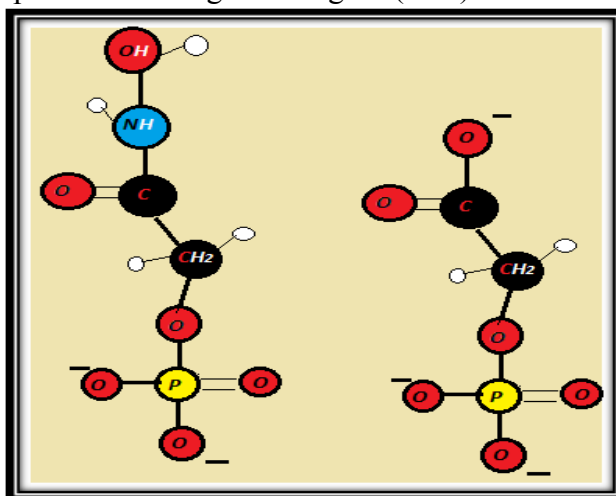


FIGURA 1.16. ESTRUCTURAS DE LOS INHIBIDORES FOSFORILADOS PGH Y 2PG.

La importancia de la caracterización termodinámica de unión de diversas moléculas posibles candidatas como blancos farmacológicos es de gran importancia por lo que resulta de sumo interés el tener caracterizado termodinámicamente diversas moléculas posibles inhibidoras, por todo lo anterior mencionado en este trabajo, resulta de interés la caracterización termodinámica de la molécula inhibidora 3-D-fosfoglicolato (3PG) figura (1.17).

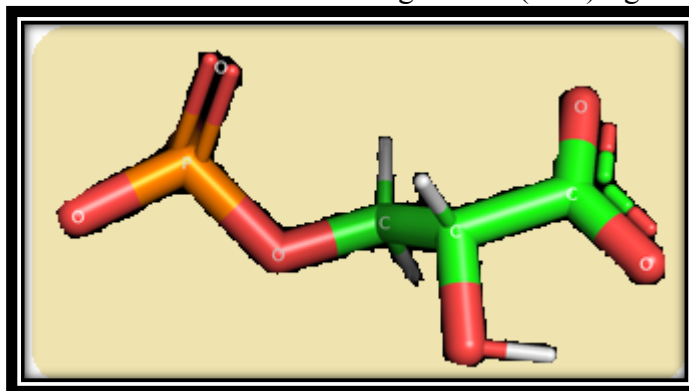


FIGURA 1.17. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL INHIBIDOR 3PG.

CAPITULO II. OBJETIVOS.

OBJETIVOS GENERAL:

Caracterizar termodinámicamente la unión del inhibidor 3-(D)-fosfoglicerato al biocatalizador de triosafosfato isomerasa.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1: Expresar en la bacteria de *E.coli* y purificar el biocatalizador *ScTIM*.
- 2: Caracterizar la enzima purificada por Dicroísmo Circular y Espectrometría de Masas.
- 3: Determinación de parámetros catalíticos de la *ScTIM*.
- 4: Determinar los parámetros termodinámicos del proceso de unión del inhibidor 3-D-fosfoglicerato a la enzima *ScTIM* (K_u , ΔH_u , ΔS_u) mediante calorimetría de titulación isotérmica.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Expresión de la ScTIM**3.1.1 Clonación de la ScTIM. Inserción del gen que codifica para la expresión de la ScTIM en *E. coli*.**

La transformación es un proceso donde las células incorporan DNA libre presente en el medio, en nuestro caso particular se trata de la inserción del gen que codifica para la expresión de la ScTIM en *E. coli*. Para que la transformación ocurra, es necesario producir células competentes, es decir propiciar las condiciones fisiológicas apropiadas para generar alteraciones en la pared y su membrana celular, lo cual permite la libre entrada de ácidos nucleicos en la célula, ver Figura 3.1. Se utilizó la cepa BL21 (DE3), *E. coli* (hospedero) y el vector pET24 (Figura 3.2) resistente a la kanamicina. La construcción del gen que codifica para la expresión de ScTIM fue realizada con GenScript [68].

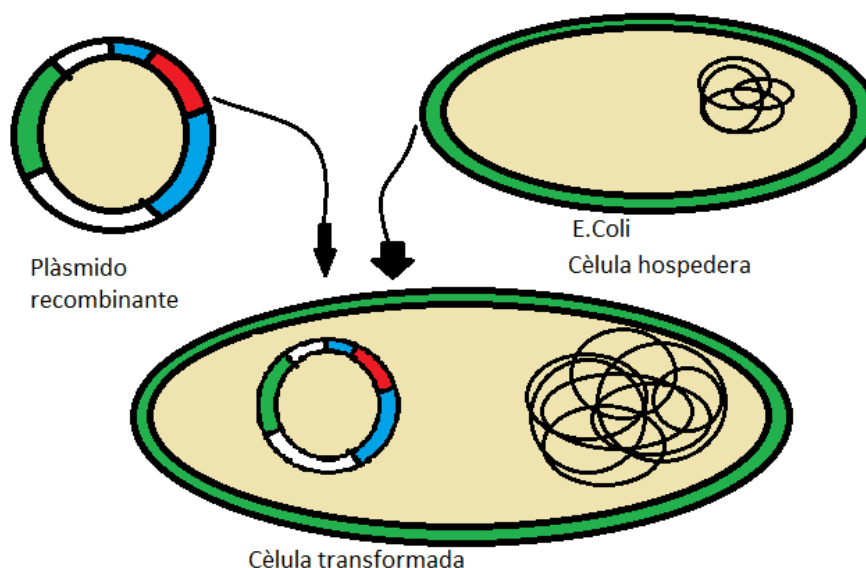


FIGURA 3.1. ELEMENTOS PARA REALIZAR LA TRANSFORMACIÓN CELULAR.

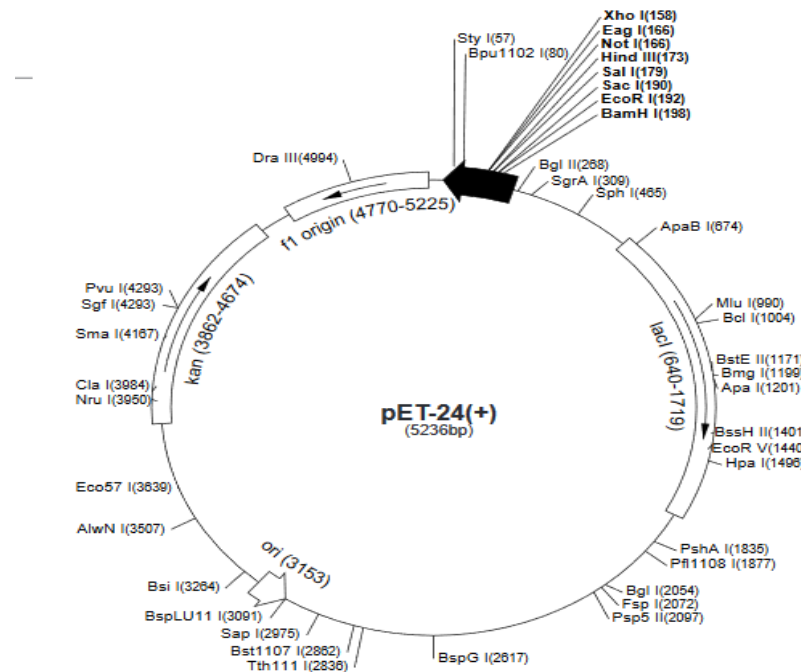


FIGURA 3.2. VECTOR DE EXPRESIÓN USADO ES EL PET24.

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la *ScTIM*, en código de tres letras, Figura 3.3. La respectiva secuencia de nucleótidos de la *ScTIM* se presenta en la Figura 3.4.

MET	ARG	THR	PHE	PHE	VAL	GLY	GLY	ASN	PHE	LYS	LEU	ASN	GLY	SER	15
LYS	GLN	SER	ILE	LYS	GLU	ILE	VAL	GLU	ARG	LEU	ASN	THR	ALA	SER	30
ILE	PRO	GLU	ASN	VAL	GLU	VAL	VAL	ILE	CYS	PRO	PRO	ALA	THR	TYR	45
LEU	ASP	TYR	SER	VAL	SER	LEU	VAL	LYS	LYS	PRO	GLN	VAL	THR	VAL	60
GLY	ALA	GLN	ASN	ALA	TYR	LEU	LYS	ALA	SER	GLY	ALA	PHE	THR	GLY	75
GLU	ASN	SER	VAL	ASN	GLN	ILE	LYS	ASP	VAL	GLY	ALA	LYS	TRP	VAL	90
ILE	LEU	GLY	HIS	SER	GLU	ARG	ARG	SER	TYR	PHE	HIS	GLU	ASP	ASP	105
LYS	PHE	ILE	ALA	ASP	LYS	THR	LYS	PHE	ALA	LEU	GLY	GLN	GLY	VAL	120
GLY	VAL	ILE	LEU	CYS	ILE	GLY	GLU	THR	LEU	GLU	GLU	LYS	LYS	ALA	135
GLY	LYS	THR	LEU	ASP	VAL	VAL	GLU	ARG	GLN	LEU	ASN	ALA	VAL	LEU	150
GLU	GLU	VAL	LYS	ASP	TYR	THR	ASN	VAL	VAL	VAL	ALA	TYR	GLU	PRO	165
VAL	TRP	ALA	ILE	GLY	THR	GLY	LEU	ALA	ALA	THR	PRO	GLU	ASP	ALA	180
GLN	ASP	ILE	HIS	ALA	SER	ILE	ARG	LYS	PHE	LEU	ALA	SER	LYS	LEU	195
GLY	ASP	LYS	ALA	ALA	SER	GLU	LEU	ARG	ILE	LEU	TYR	GLY	GLY	SER	210
ALA	ASN	GLY	SER	ASN	ALA	VAL	THR	PHE	LYS	ASP	LYS	ALA	ASP	VAL	225
ASP	GLY	PHE	LEU	VAL	GLY	GLY	ALA	SER	LEU	LYS	PRO	GLU	PHE	VAL	240
ASP	ILE	ILE	ASN	SER	ARG	ASN									247

FIGURA 3.3 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA ScTIM.

```

A T G G C G T A C C T T C T T C G T G G G T G G C
A A C T T C A A A C T G A A T G G C A G C A A G C
A A A G C A T C A A G G A G A T T G T G G A G C G
T C T G A A T A C C G C G A G C A T C C C G G A G
A A C G T T G A A G T G G T T A T T T G C C C G C
C G G C G A C C T A C C T G G A C T A T A G C G T
T A G C C T G G T G A A G A A A C C G C A G G T T
A C C G T G G G C G C G C A A A A C G C G T A C C
T G A A G G C G A G C G G C G C G T T C A C C G G
C G A G A A C A G C G T G G A C C A G A T C A A G
G A T G T T G G C G C G A A A T G G G T G A T T C
T G G G T C A C A G C G A G C G T C G T A G C T A
T T T C C A C G A A G A C G A T A A A T T T A T C
G C G G A T A A G A C C A A A T T T G C G C T G G
G T C A G G G C G T T G G T G T G A T C C T G T G
C A T T G G C G A A A C C C T G G A G G A A A A G
A A A G C G G G C A A G A C C C T G G A C G T G G
T T G A A C G T C A A C T G A A C G C G G T T C T
G G A G G A A G T G A A A G A T T G G A C C A A C
G T G G T T G T G G C G T A C G A G C C G G T T T
G G G C G A T T G G T A C C G G T C T G G C G G C
G A C C C C G G A A G A C G C G C A A G A T A T C
C A C G C G A G C A T T C G T A A G T T C C T G G
C G A G C A A G C T G G G T G A C A A A G C G G C
G A G C G A A C T G C G T A T T C T G T A T G G T
G G C A G C G C G A A C G G C A G C A A C G C G G
T T A C C T T T A A G G A T A A A G C G G A C G T
G G A T G G T T T T C T G G T G G G T G G T G C G
A G C C T G A A G C C G G A G T T T G T G G A C A
T T A T C A A C A G C C G T A A C T A A

```

FIGURA 3.4 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS (OPTIMIZADA PARA E. COLI).

3.1.2. Protocolo de transformación para BL21 (DE3) empleando células competentes (C2527).

A continuación, se describen los pasos realizados en la transformación de acuerdo al protocolo del proveedor:

1. (Para C2527H) descongelar un tubo de BL21 (DE3) células de *E. coli* competentes en hielo por 10min. (Para C2527I) descongelar un tubo de BL21 (DE3) células competentes *E. coli*, hasta que el ultimo cristal de hielo desaparezca. Mezclar suave y cuidadosamente, pipetear 50µL de células en un tubo de transformación. Manejar siempre las muestras sobre hielo.
2. Añadir 1-5µl conteniendo 1pg-100ng de plásmido de DNA y mezclar las células. Golpee suavemente el tubo de 4-5 veces para mezclar las células competentes de DNA. **No agitar en vortex.**
3. Colocar la mezcla sobre hielo durante 30 min. No mezclar.
4. Realizar un choque térmico a 42 °C por exactamente 10 segundos. No mezclar.
5. Colocar en hielo durante 5 minutos. No mezclar.
6. Pipetear 950µL de SOC (medio de caldo súper-óptimo con represión por catabólito) a temperatura controlada en la mezcla.
7. Colocar a una temperatura de 37 °C durante 60min. Agitar con vortex (250rpm).
8. Calentar las placas de selección a 37 °C.
9. Mezclar bien las células agitando e invirtiendo el tubo, realizar diluciones varias veces (una serie de 10 veces) en SOC.

3.2. Etapas de expresión y purificación de Triosafosfato Isomerasa de levadura ScTIM.

Tanto la expresión como la purificación de ScTIM se realizaron en el Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química (UAM-I). Los procedimientos y metodología empleados son una modificación a los previamente descritos en [69].

Para la expresión de la ScTIM, se empleó medio de cultivo Luria-Bertani, kanamicina a 25 mg/mL, agitación a 220 rpm y 37 °C. En la inducción de la sobreexpresión de la ScTIM se utilizó isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.4 mM, el cual fue añadido al matraz de cultivo cuando este alcanzó una densidad óptica de 0.6-0.8 a 600 nm. Se continuó con el crecimiento celular por alrededor de 4.5-5.0 h. El crecimiento celular se realizó en una incubadora con agitador orbital, de la marca (INO-650M), a 220 rpm y 37 °C. Se utilizaron 4 matraces de 2 L, con 500 mL de medio cada uno (como se muestra en Figura 3.5).

La separación de las células del medio de cultivo se realizó, por centrifugación (6000 rpm, por 15min y 4 °C). La lisis celular se realizó por sonicación usando una potencia de 30 Watt y una frecuencia de 2.0 kHz, se llevó acabo en presencia de solución reguladora de Tris 10 mM, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.20 mM, pH 8.0 (Figura 3.6). Posteriormente la solución resultante se centrifugó a 11,000 rpm, 4 °C, durante 20 min. El sobrenadante que contiene a la *ScTIM* se separó en dos pasos de precipitación diferencial con sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, la primera se realizó de 0-64% de saturación y finalmente de 64-90% de saturación a una temperatura de 4 °C.



FIGURA 3.5 CRECIMIENTO CELULAR DE LA *ScTIM*, SE LLEVÓ ACABO EN CONDICIONES DE TEMPERATURA DE 37 °Y UNA AGITACIÓN ORBITAL DE 220rpm.

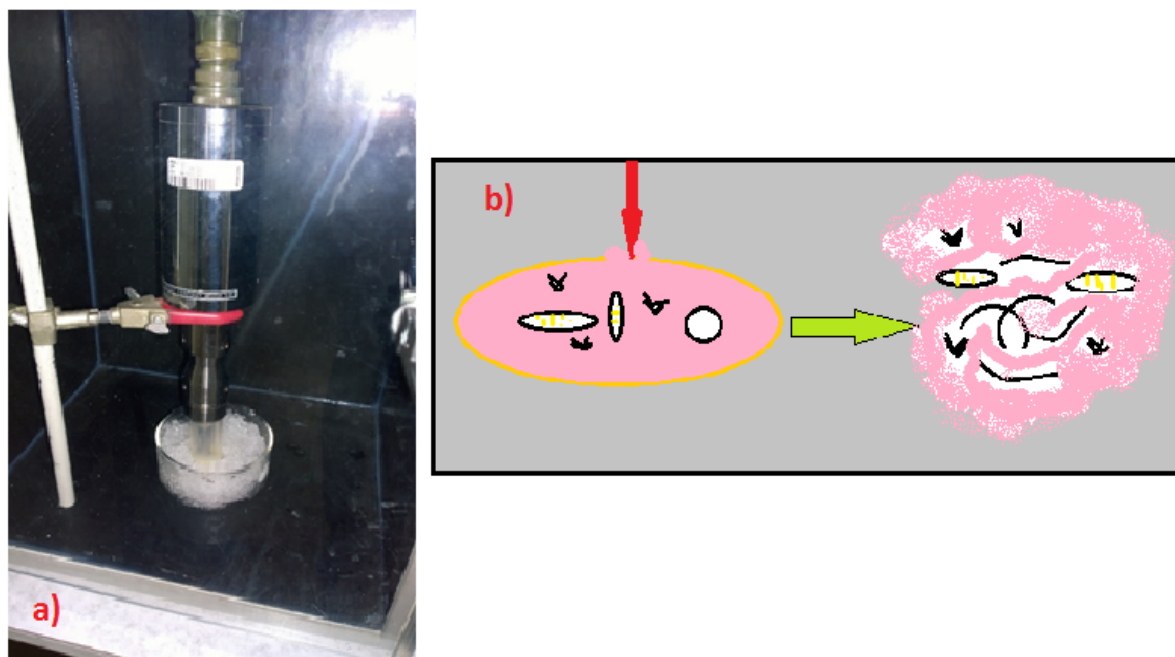


FIGURA 3.6 A) RUPTURA CELULAR. SE REALIZÓ POR SONICACIÓN UTILIZANDO UN EQUIPO BRANSON SONIFIER 450, B) REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA RUPTURA CELULAR, UNA VEZ REALIZADA LA LISIS CELULAR SE DESPRENDE EL MATERIAL SOLUBLE, DE DONDE SE ENCUENTRA LA ENZIMA DE INTERÉS ENTRE OTRAS.

El precipitado a 90% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que contiene a la ScTIM se resuspendió y dializó en el amortiguador trietanolamina (TEA) 10 mM, EDTA 1mM, pH 8.6. La muestra fue cargada en una columna de exclusión molecular (Superdex 200 16/60), montada en un equipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography); la columna fue previamente equilibrada con el amortiguador TEA 10 mM, EDTA 1mM, pH 8.6. Las fracciones de interés se colectaron y se cargaron en una columna de intercambio aniónico (matriz DEAE), previamente equilibrada con TEA 10 mM, EDTA 1mM, pH 8.6, colectando la fracción no adherida a la columna (es decir la fracción que no se une). Se procedió a verificar la pureza de la ScTIM mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS).

3.3. Determinación de la concentración de la ScTIM.

Para determinar la concentración de la enzima ScTIM, se utilizó su respectivo coeficiente de absortividad molar $\epsilon^{280} = 2.67 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [70]. Las muestras de ScTIM purificada se mantuvieron a una concentración entre 7.5 y 8.0 mg/mL, en un regulador de TEA 10 mM, EDTA 1mM, pH 7.4.

En la figura 3.7 se muestra el diagrama de bloques de las etapas que van desde la expresión hasta la concentración de la ScTIM.

Medio de cultivo LB: 10 g de peptona, 5 g de levadura, 10 g NaCl (autoclave 121 °C, 15 min).

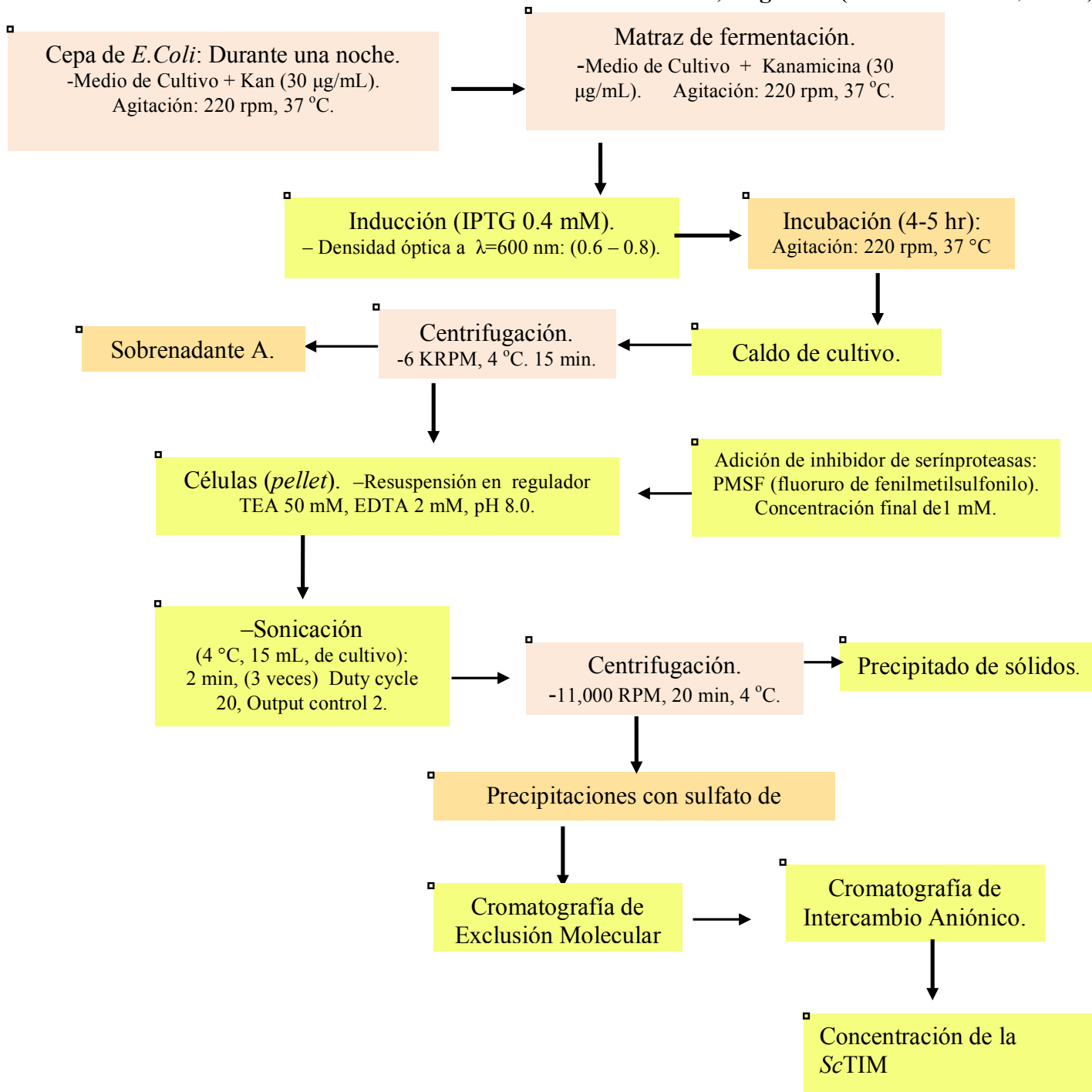


FIGURA 3.7 DIAGRAMA DE BLOQUES DE LA EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ScTIM.

3.4. Espectroscopía de Dicroísmo Circular.

La técnica de Dicroísmo Circular (DC) es una técnica espectroscópica que se basa en la interacción de una molécula quiral con la luz polarizada. Esta técnica es ampliamente utilizada debido a su importancia para la caracterización estructural tanto de moléculas pequeñas como de macromoléculas [71]; particularmente se utiliza en estudios con proteínas, ya que los enlaces peptídicos presentan actividad óptica en el UV lejano (180- 250) al formar estructuras secundarias; también los aminoácidos aromáticos producen señales características a longitudes de onda entre (250-300 nm) debido al entorno electrónico asimétrico en el que se encuentran.

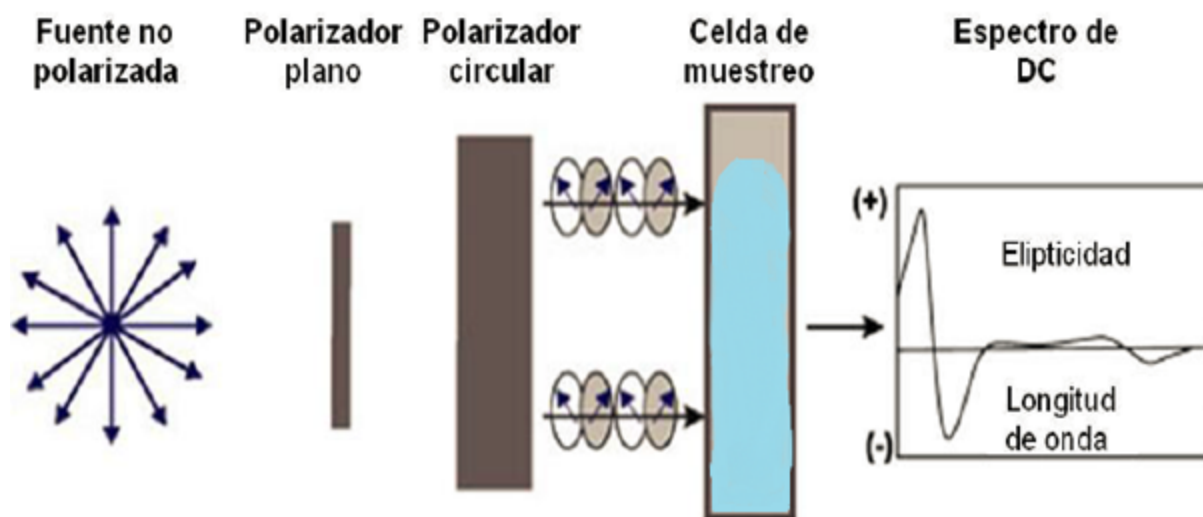


FIGURA 3.8 ESQUEMA DE UN EQUIPO DE DC EN EL QUE SE MIDE LA DIFERENCIA EN ABSORCIÓN [72].

Un material presenta dicroísmo circular cuando absorbe luz circularmente polarizada en una dirección (izquierda) con mayor intensidad que la luz circularmente polarizada en la dirección opuesta (derecha) ver figura 3.8 [73]. La presencia de una señal de dicroísmo circular indica que la muestra contiene alguna estructura que es quiral lo que significa que se encuentra en dos formas las cuales no son superponibles y son imágenes especulares una de la otra. La quiralidad es una propiedad con la que cuentan muchas moléculas biológicas, por lo que las medidas de DC nos proporcionan información estructural de proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos [74].

En el caso particular del estudio de proteínas la técnica de DC resulta de gran importancia ya que nos permite realizar estudios estructurales en condiciones muy semejantes al medio donde llevan a cabo sus funciones normalmente, que es en solución acuosa; un claro ejemplo de ello es el estudio de la patología del Alzheimer, ya que por medio de DC se puede seguir la transformación de un péptido en las fibrillas destructivas [75].

Las muestras de ScTIM fueron dializadas contra un amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, 1.0 mM de EDTA, pH 7.4. Se obtuvo el espectro de la ScTIM en la región del UV lejano (190 - 250 nm) utilizando un espectropolarímetro JASCO J-175 (Jasco Inc. Easton, MD) el cual cuenta con una porta celdas tipo peltier que controla la temperatura y la agitación magnética. La concentración de la ScTIM fue de 0.10 mg/mL, la cual fue colocada en una celda de 1.0cm de recorrido óptico y mantenida a 25.0 °C. Cabe mencionar que el espectro reportado es el resultado del promedio de tres barridos subsecuentes y está corregido por la línea base del amortiguador. La elipticidad molar $[\theta]$ por residuo se calculó utilizando una masa de 108 gramos por mol de residuo de aminoácido.

3.5. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica muy recurrida por su alto grado de confiabilidad debido a su precisión y sensibilidad en la determinación tanto de masas moleculares, como de estructuras moleculares complejas; también es útil en la determinación de las relaciones isotópicas de los átomos en una muestra determinada. Por ello, los espectros de masas son muy utilizados en el análisis de proteínas y péptidos. Los espectros de masas requieren de la conversión de una muestra de interés en iones en estado gaseoso, estos iones se desplazan a gran velocidad en presencia de un campo magnético y se separan en función de su relación masa/carga (m/z) [76]. Las etapas en la determinación de masas son las siguientes:

- a) Generación de moléculas en fase gaseosa.
- b) Ionización de las moléculas
- c) Separación respecto a la relación m/z
- d) Detección de los iones

La determinación del espectro de masas de la ScTIM se realizó en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas de la UAM-I, para lo cual se requirieron 2.0 mL de solución de la ScTIM. El equipo utilizado fue un Bruker Daltonics flexAnalysis.

3.6. Actividad enzimática de la ScTIM.

Como se mencionó anteriormente las enzimas actúan como catalizadores de reacciones químicas. Uno de los puntos a resaltar de las enzimas es que son mucho más eficientes que cualquier catalizador artificial, mediante experimentaciones se ha podido comprobar que los aumentos de velocidad que las enzimas producen son de hasta más de 10^{20} veces la velocidad de la reacción no catalizada [77]. La cinética enzimática muestra un comportamiento característico que es la saturación de la enzima por el sustrato (figura 3.9). Al medir la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima, se observa que para bajas concentraciones de sustrato la velocidad de la reacción es proporcional a dicha concentración como sucede con las reacciones no-enzimáticas, pero a concentraciones de sustrato mayores el aumento en la velocidad de reacción deja de ser proporcional a esta y se aproxima asintóticamente a un valor máximo, el cual es característico de cada enzima y se conoce como velocidad máxima (V_{max}), que es cuando la enzima se encuentra saturada de sustrato. Por otro

lado, la concentración de sustrato a la cual la reacción alcanza la mitad de su velocidad máxima, se conoce como la constante de Michaelis-Menten (K_M), que es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato.

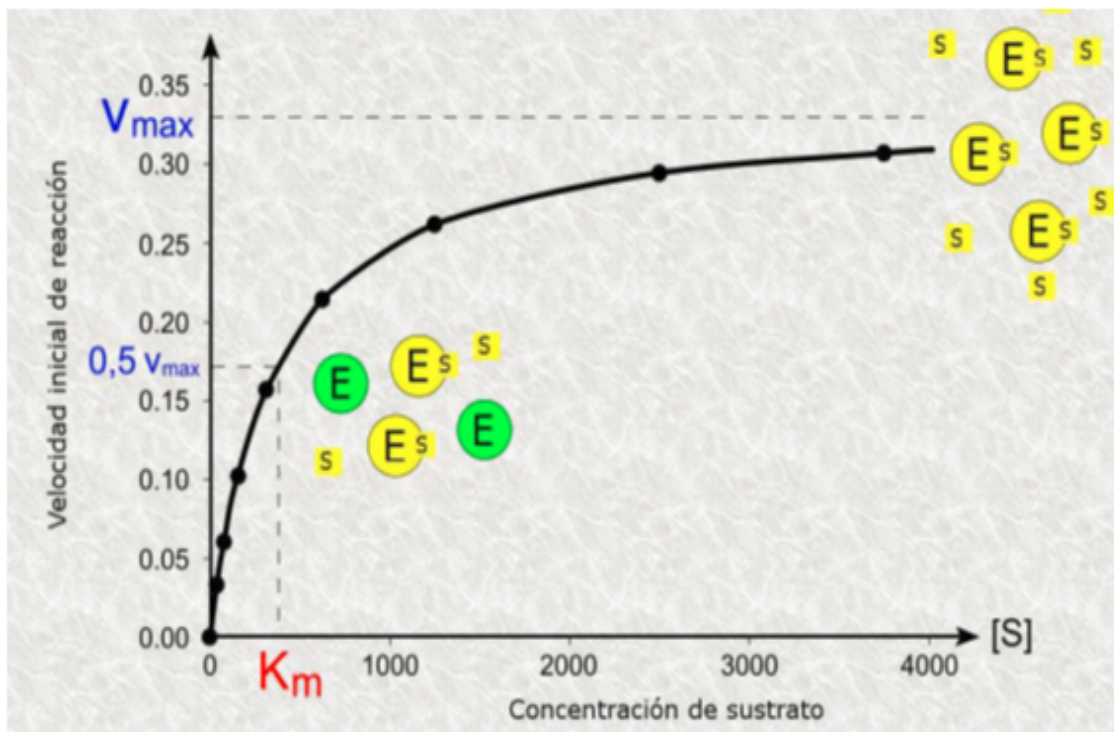


FIGURA 3.9 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN SEGÚN EL MECANISMO DE MICHAELIS-MENTEN [78].

Se determinó la actividad catalítica de la ScTIM midiendo la velocidad de conversión del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (figura 3.10), a través de una reacción acoplada en la que la enzima α -glicerofosfato deshidrogenasa (α -GDH) reduce la DHAP en α -glicerofosfato. Esta reacción consume una mol de NADH por mol de DHAP que reacciona. Con un exceso de α -GDH, la velocidad de producción de DHAP, es equivalente a la velocidad de oxidación de NADH (ϵ_{NADH} (340nm) = 6,220 M⁻¹ cm⁻¹). Los experimentos se realizaron en buffer de TEA 100 mM, EDTA 1mM, pH 7.4 y se colocó α -GDH (17 μ g/mL), NADH (0.2 mM) y DGAP.

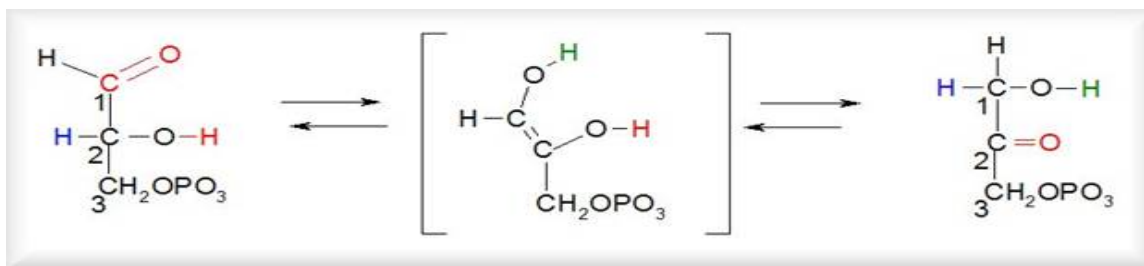


FIGURA 3.10. REACCIÓN CATALIZADA POR LA ScTIM LA INTERCONVERSIÓN DE DHAP A DGAP.

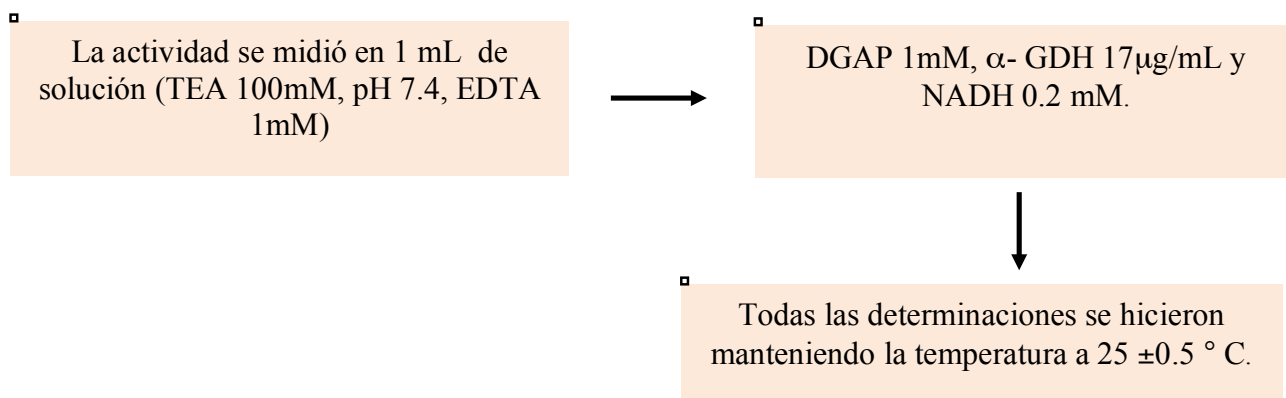


FIGURA 3.11 ESQUEMA DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA *ScTIM*.

3.7. Espectroscopía de fluorescencia.

Este método se basa en la disminución que sufre la fluorescencia intrínseca de la enzima al unir un inhibidor fosforilado en el sitio catalítico. El apagamiento de la fluorescencia de la *ScTIM* se debe principalmente al Trp168, ubicado en el asa 6 del sitio catalítico, que se aproxima al inhibidor cargado y unido durante el movimiento de cierre que sufre esta asa [79]. Debido a la diferencia en rendimiento cuántico que muestra la enzima en su estado asociado respecto a su forma libre, es posible titular a la *ScTIM* con inhibidor y cuantificar la población de moléculas de enzima libre, enzima asociada e inhibidor no unido, y con ello determinar la constante de equilibrio de unión (K_u).

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas a una temperatura de 25 °C en un espectrofluorómetro PC1 de ISS (Champaign, IL, USA) equipado con un porta celdas que contiene una camisa de circulación de agua y un baño con termostato. Todos los experimentos se realizaron en un amortiguador de 50 mM de Tris, 5 mM de EDTA, pH 7.4. Tanto la solución de proteína como el amortiguador se filtraron a través de membranas de 0.22μm de diámetro antes de cada experimento para eliminar posibles partículas suspendidas. La concentración de *ScTIM* en la celda fue de 0.050 mg/mL. Se utilizó una solución del inhibidor 3-D-fosfoglicerato en concentración 0.20 M. Se adicionaron 37μL de inhibidor a 2.0 mL de enzima. Las condiciones empleadas para la obtención de los espectros fueron las siguientes: longitud de onda excitación de 280nm, con un ancho de banda de 4nm, usando un intervalo de longitud de onda de la emisión entre 300 y 400nm, y un ancho de banda de 16nm.

3.8. Calorimetría de titulación isotérmica.

Esta técnica involucra la medición del calor liberado o absorbido cuando se titula con un reactivo una solución que contiene las otras sustancias necesarias para llevar a cabo la reacción a temperatura constante. Las reacciones de asociación proteína-ligando pueden estudiarse por este método dando buenos resultados con respecto a los parámetros de unión: K_u , ΔS_u , ΔH_u y el número de sitios n en un solo experimento.

La mayoría de los calorímetros funcionan con el mismo principio y tienen los mismos elementos básicos en su diseño de operación como se puede apreciar en la figura 3.12. El calorímetro consta de dos celdas idénticas, una es conocida como la celda de referencia (R) la cual está llena de agua, y la otra se llena con la solución de muestra (M), generalmente la proteína receptora; ambas celdas están inmersas en una chaqueta térmica, con el propósito de aislarlas lo más posible del medio exterior y conseguir la menor ganancia o pérdida de energía con su entorno.

Al realizar la primera inyección tanto la proteína como el ligando están en contacto con la celda M, donde se suscita una liberación o absorción de calor, sufriendo la celda M un calentamiento o enfriamiento, lo que provoca un cambio en la temperatura original. El equipo suministra energía a la celda que se encuentra a menor temperatura con el propósito de restablecer la temperatura de trabajo y esa potencia suministrada es la que registra el calorímetro como asociada la inyección respectiva.

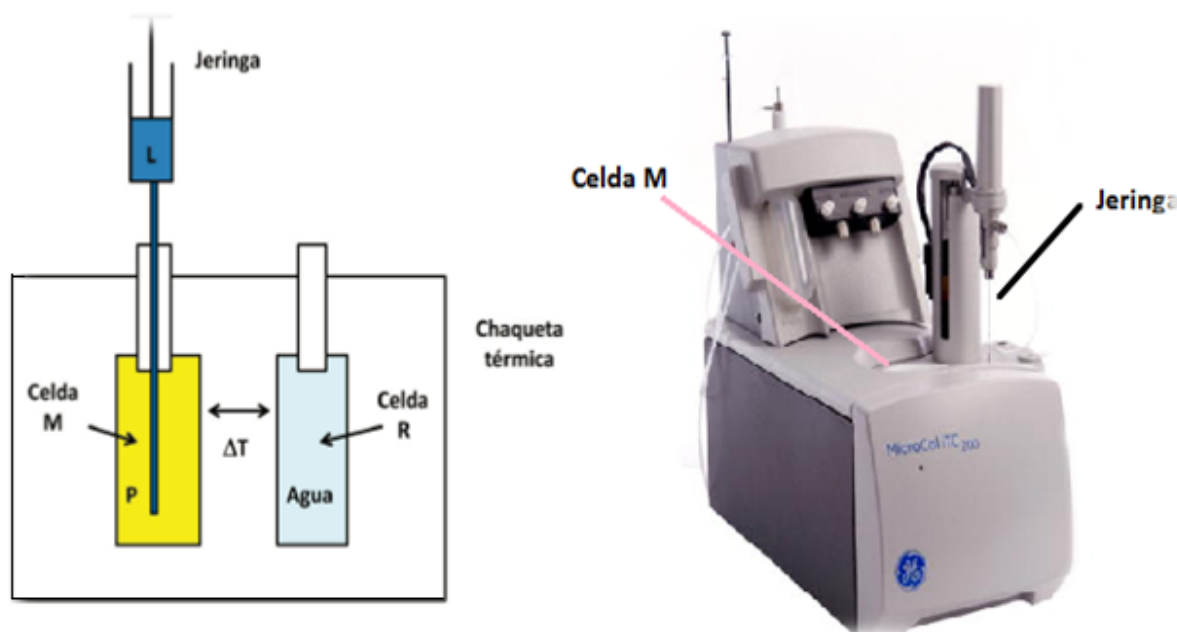


FIGURA 3.12 SE MUESTRAN LOS ELEMENTOS BÁSICOS DE UN CALORÍMETRO, ASÍ COMO EL CALORÍMETRO EMPLEADO EN LA EXPERIMENTACIÓN.

En el presente trabajo se utilizó un nanocalorímetro de titulación isotérmica (CTI) iTC200 de MicroCal de la marca LG. La cantidad de proteína *ScTIM* necesaria para llenar la celda de muestra es de 200 μL , mientras que en la jeringa de inyección se colocaron 40 μL del inhibidor (3PG). Las condiciones utilizadas en los experimentos de titulación, se muestran en las siguientes tablas (3.1) y (3.2):

Número total de inyecciones	26
Temperatura de la celda (°C)	25.0
Potencia de referencia ($\mu\text{cal/s}$)	12
Retardo inicial (s)	200
Concentración en la jeringa (mM)	30
Concentración en la celda (mM)	0.015
Velocidad de agitación (rpm)	700

TABLA 3.1 CONDICIONES INICIALES DE LA EXPERIMENTACIÓN EN C.T.I.

# Inyección	Volumen (μ)	Duración (s)	Espaciamento (s)
1	0.3	0.6	100
2	1.0	2.0	240
3	1.0	2.0	240
4	1.0	2.0	240
5	1.0	2.0	240
6	1.0	2.0	240
7	1.5	2.0	240
8	1.5	3.0	240
9	1.5	3.0	240
10	1.5	3.0	240
11	1.5	3.0	240
12	1.5	3.0	240
13	1.5	3.0	240
14	1.5	3.0	240
15	1.5	3.0	240
16	1.5	3.0	240
17	1.5	3.0	240
19	1.5	3.0	240
20	1.5	3.0	240
21	1.5	3.0	240
22	2.0	4.0	240
23	2.0	4.0	240
24	2.0	4.0	240
25	2.0	4.0	240
26	2.0	4.0	240

TABLA 3.2. PROGRAMA DE INYECCIONES DE LA TITULACIÓN CALORIMÉTRICA DE LA SctIM CON EL INHIBIDOR 3-D-FOSFOGLICERATO.

CAPITULO IV: RESULTADOS.

4.1. La transformación de las células competentes de *E. coli*.

La inserción del gen de la *ScTIM* en el plásmido de expresión pET24 fué exitosa, como puede observarse en la Figura 4.1. El tamaño esperado (6000pb) para el gen de la *ScTIM* sumado al del vector(2000pb) concuerda con el observado en el carril 2 (6000pb).

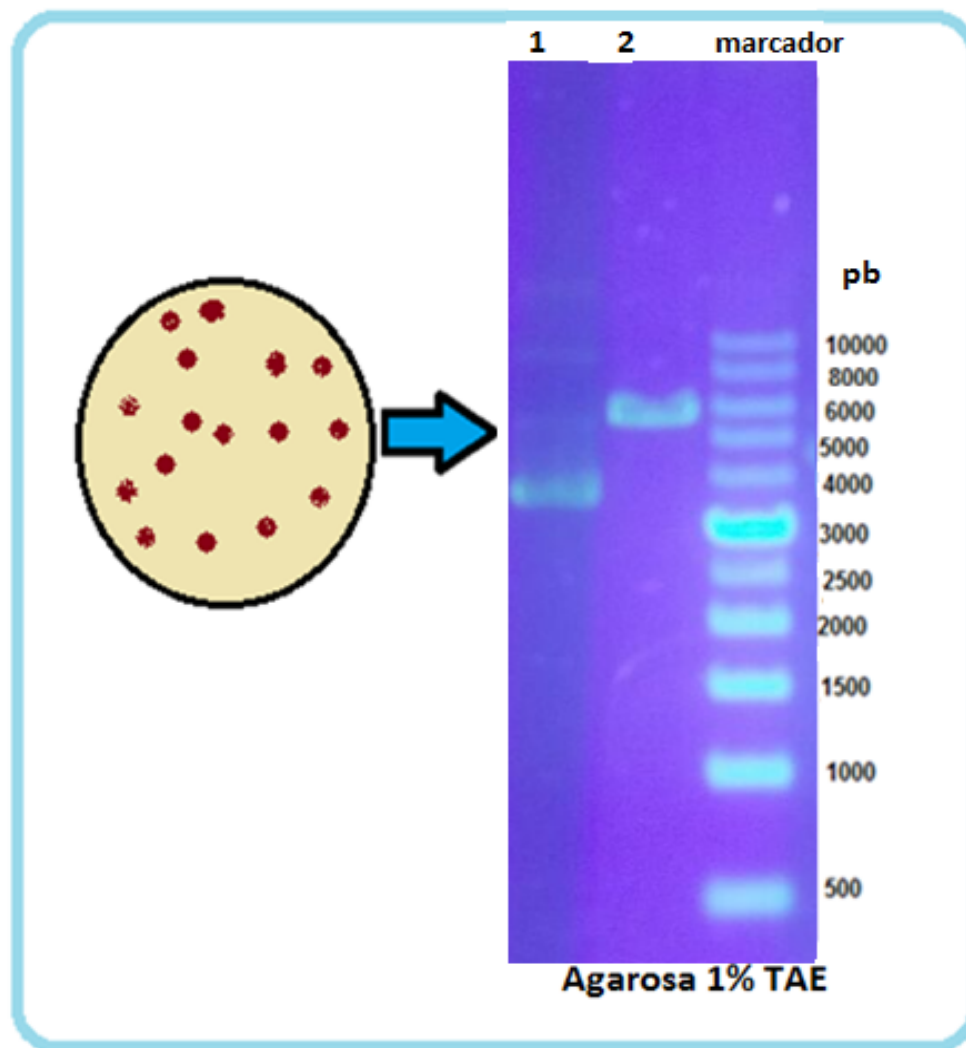


FIGURA 4.1. GEL DE AGAROSA. EN EL CARRIL 1 SE COLOCÓ EL PLÁSMIDO INTACTO Y EN EL CARRIL 2, EL MISMO PLÁSMIDO DIGERIDO CON EcoRI CUYA LONGITUD DE PARES DE BASES CORRESPONDE CON EL TAMAÑO DEL PLÁSMIDO AUMENTADO CON LA SECUENCIA DEL GEN DE LA *ScTIM*.

La transformación de *E. coli* se hizo con dos cepas, una que crece a 30 °C (SHUFLE T7 Express LysY), y otra a 37 °C Sólo en ésta última (BL21 (DE3), hubo presencia de colonias transformantes tal como se muestra en la siguiente imagen (Figura 4.2).

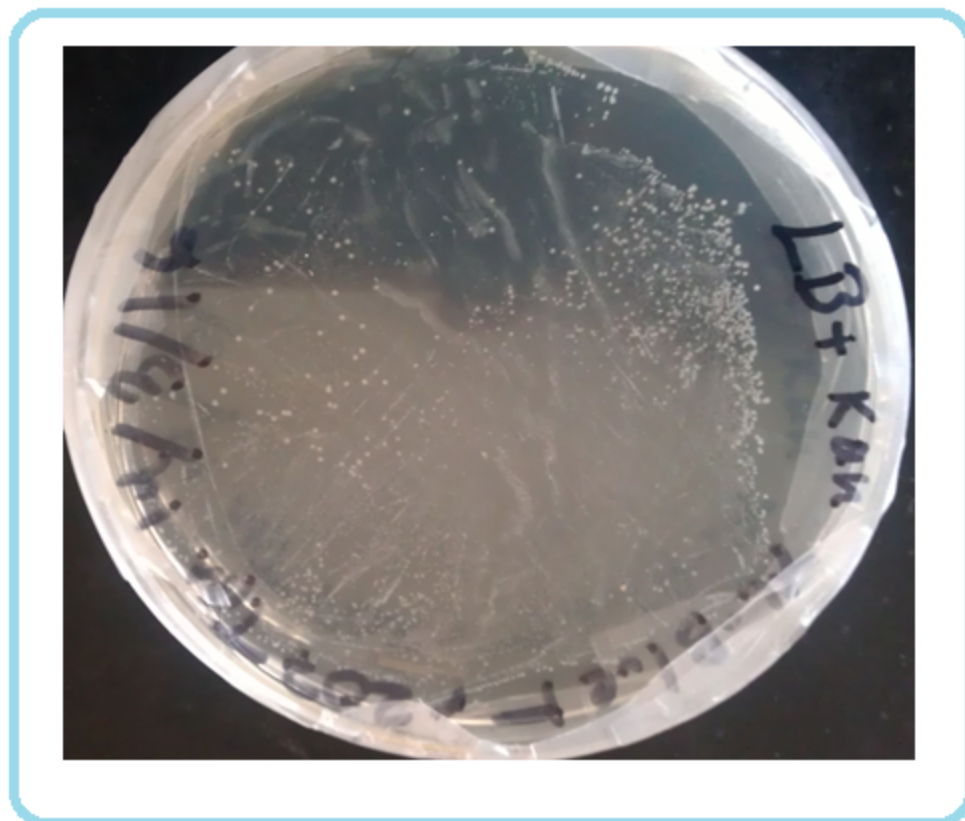


FIGURA 4.2. PRESENCIA DE COLONIAS TRANSFORMANTES (PUNTOS BLANCOS), DESPUÉS DEL OVERNIGHT, SE UTILIZÓ MEDIO LB EN PRESENCIA DE KANAMICINA 0.40mM.

4.1. Expresión y purificación de la ScTIM.

De acuerdo a la figura (4.3a) se observa que los mejores tiempos de crecimiento fueron de 180-210min ya que en este tiempo se obtiene una absorbancia entre 0.4-0.6 a 600 nm, siendo las condiciones ideales en las cuales se expresa la ScTIM de acuerdo al protocolo de referencia [69]. La Figura (4.3b) muestra los resultados del análisis de proteína por SDS-PAGE de extractos celulares una vez finalizado el periodo de crecimiento, se analizaron cinco muestras todas provenientes del mismo lote. Claramente se ve la presencia de la ScTIM, la cual corresponde a las bandas pronunciadas cercanas a los 30KDa.

Después de 4 horas de añadir el inductor IPTG se tomaron muestras de los diferentes matraces, se sometieron a ruptura celular y se analizaron por SDS-PAGE (Figura 4.4 a, muestras 1, 2, 3, 4 y 5). En la Fig. 4b, se presenta un gel de poliacrilamida con las fracciones de la primera purificación, producto de los dos pasos de precipitación diferencial con sulfato de amonio: carriles 1, 2 y 3, fracción de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 90%; y los carriles 4, 5 y 6 corresponden a la fracción de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 64%. Se puede observar la presencia de ScTIM, entre en el carril correspondiente cercano a los 30KDa.

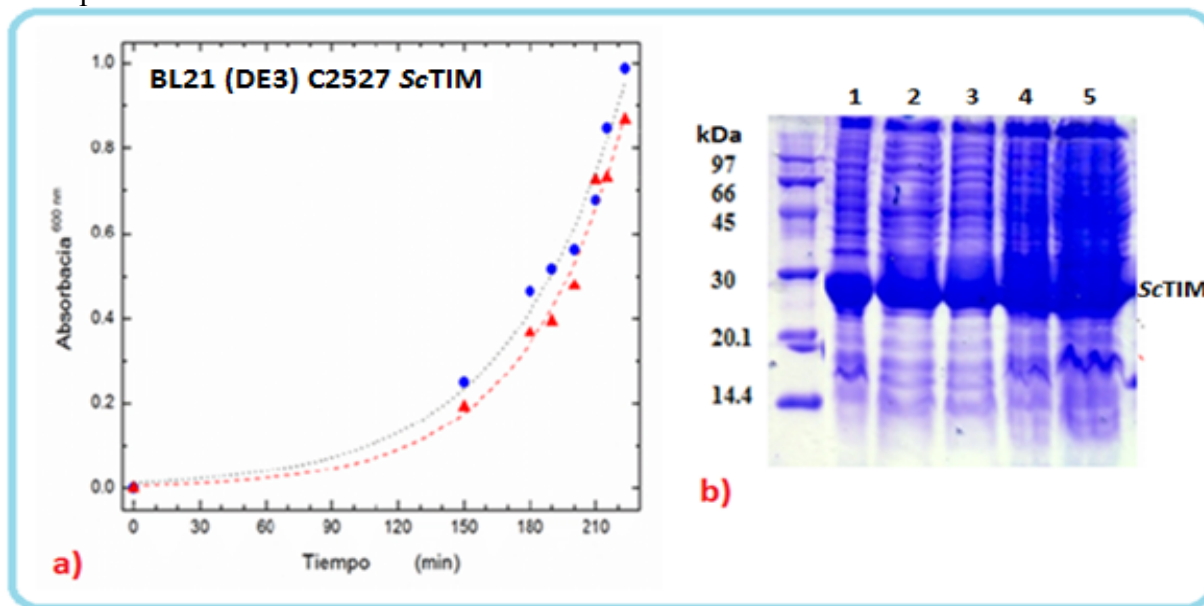


FIGURA 4.3.A) CURVA DE ABSORBANCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO DE *E. COLI*. B) GEL DE AGAROSA CARGADO CON LOTES DE PROTEÍNA (30 μL) ScTIM, SE PUEDE VER QUE ALREDEDOR DE MENOS DE 30kDa, SE ENCUENTRA LA ENZIMA ScTIM.

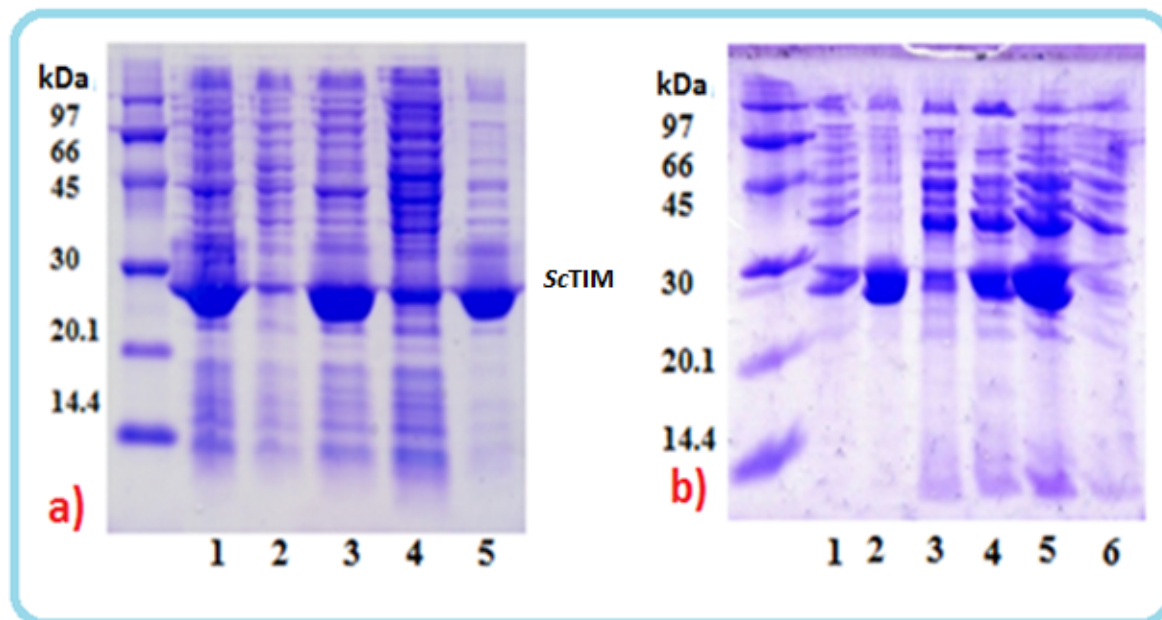


FIGURA 4.4. GELES DE ACRILAMIDA DE LA ScTIM A) POSTERIOR A LA LISIS Y B) POSTERIOR A LA PRECIPITACIÓN CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 64% (CARRILES 4,5 Y 6) Y 90% (CARRILES 1,2 Y 3) EN CADA POSILLO FUERON DEPOSITADOS 3 μL DE ScTIM.

En la figura (4.5a) se presenta el cromatograma típico obtenido de la cromatografía de exclusión molecular de la fracción previamente purificada por precipitación con $(NH_4)_2SO_4$. En la figura (4.5b) se presenta el gel de electroforesis en presencia de SDS de la fracción marcada en el cromatograma (pico cercano a los 100 mL) dividida en cuatro partes. En este pico mayor, se tiene la certeza de una presencia con más contenido de ScTIM.

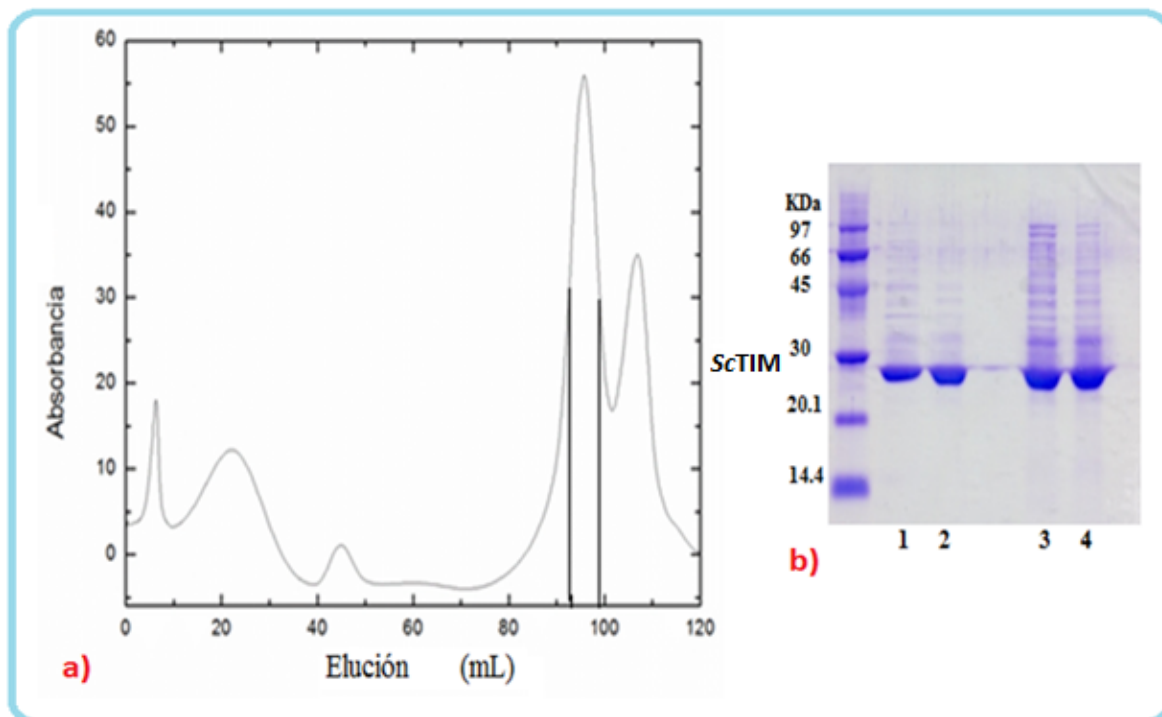


FIGURA 4.5. a) CROMATOGRAMA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR Y GEL DE ACRILAMIDA EL PICO MARCADO ENTRE 95mL Y 100mL ES LA PARTE COLECTADA Y DE DONDE TOMARON CUATRO MUESTRAS b) PARA LA REALIZACIÓN DEL GEL DE ACRILAMIDA SDS-PAGE.

El paso final de purificación consistió en una cromatografía de intercambio iónico. La figura 4.6 muestra el cromatograma obtenido en esta etapa final. La homogeneidad de la preparación obtenida en el Pico 1, colectado en varios tubos, se analizó a través de SDS-PAGE y el resultado se muestra en la figura 4.7. En el pico 2 se aprecia muestra que se pega en la columna. A partir de 2.0 litros de cultivo celular inicial se obtuvieron en promedio 25 mL de solución concentrada de ScTIM a 7.0 mg/mL. Es decir, el rendimiento en la producción de proteína fue de alrededor de 85mg de enzima por litro de cultivo.

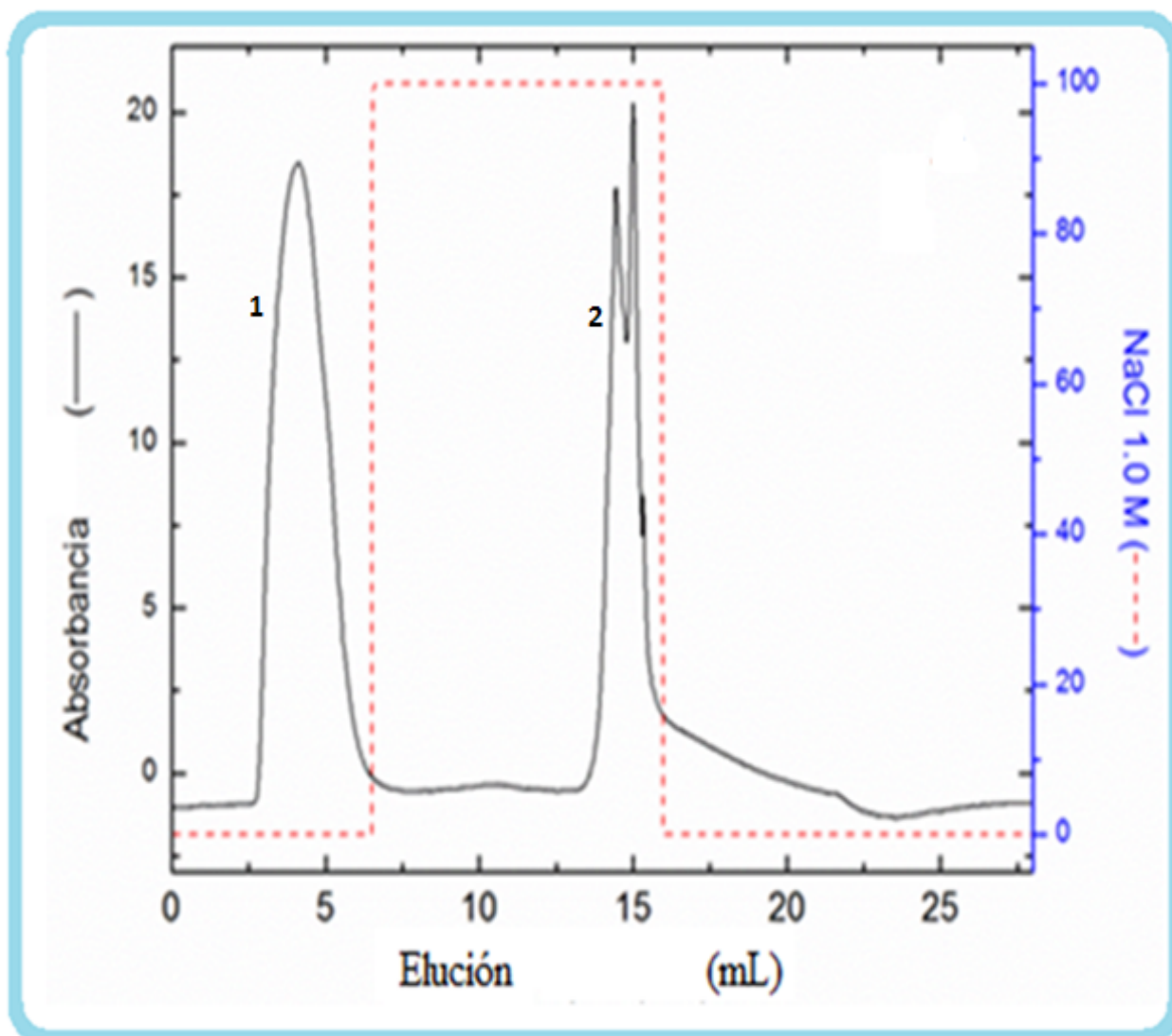


FIGURA 4.6.- CROMATOGRAMA DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO (DEAE BIORAD), pH 8.5, EL GRADIENTE DE ELUCIÓN DE NaCl , SUBE REPENTINAMENTE HASTA ALCANZAR EL 100% Y SE MANTIENE CONSTANTE HASTA LLEGAR APROXIMADAMENTE A 16 mL, BAJANDO DE MANERA DRÁSTICA HASTA UN 0% NaCl .

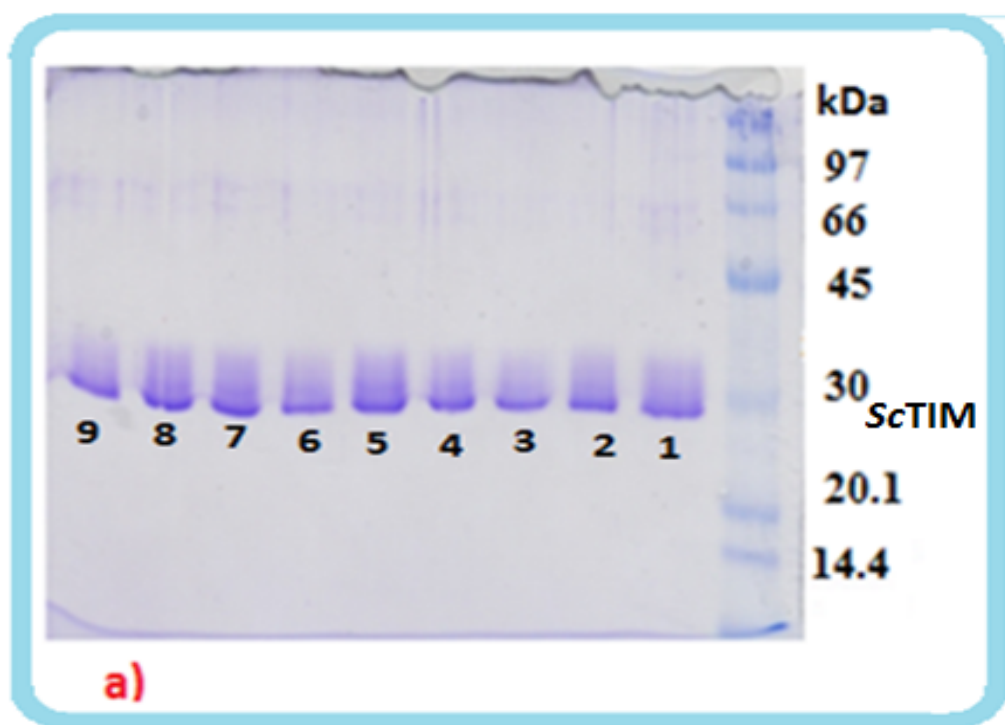


FIGURA 4.7. SE MUESTRA EL GEL DE ACRILAMIDA DE 9 FRACCIONES CONSECUTIVAS PERTENECIENTES AL PICO 1 DEL CROMATOGRAMA DE INTERCAMBIO IÓNICO DE LA FIGURA ANTERIOR. SE TOMARON $3\mu\text{L}$ DE MUESTRA DE ScTIM, POR CADA MUESTRA. CON ESTO SE VE CLARAMENTE LA PUREZA DE LA ScTIM.

4.2. Espectro de dicroísmo circular de la ScTIM silvestre.

La Figura 4.8 muestra el espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de la ScTIM, a pH de 7.4 y 25 °C, donde se observan dos mínimos de elipticidad en la región de 210-220 nm, típico del espectro de la ScTIM.

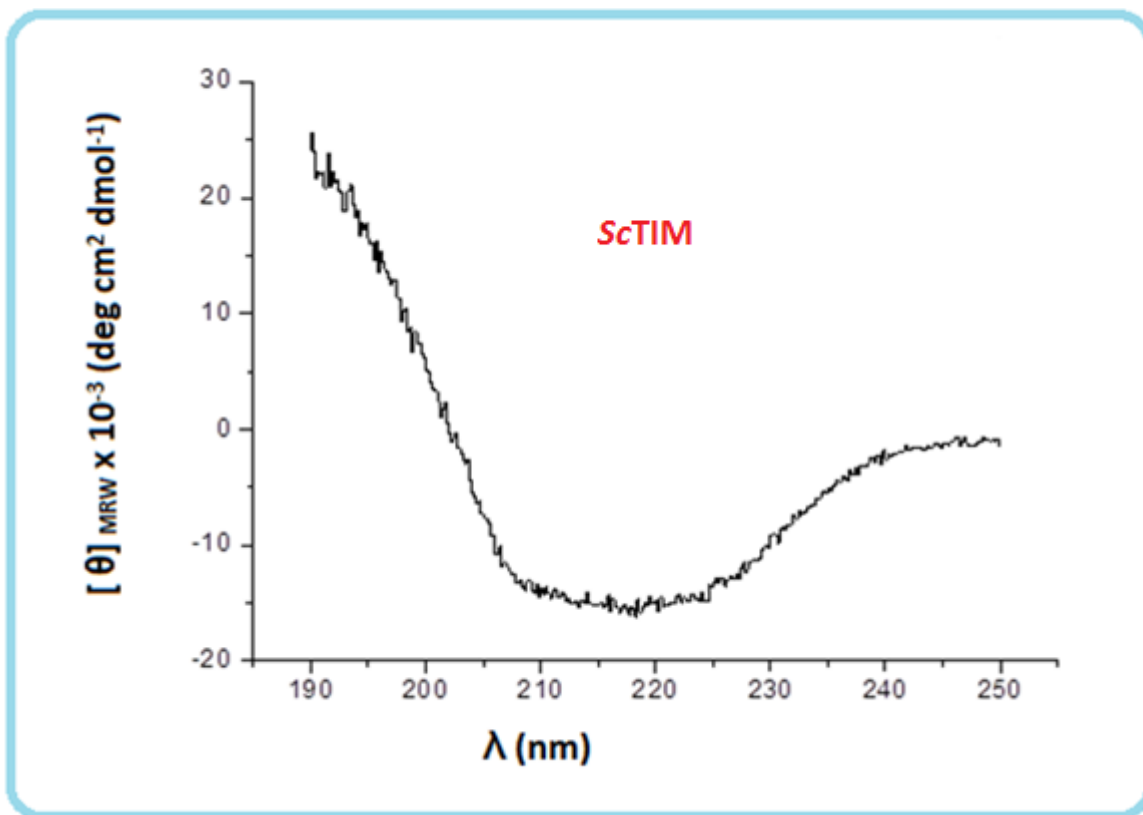


FIGURA 4.8 ESPECTRO DE DC DE LA ScTIM EN REGULADOR DE FOSFATOS, UN pH DE 7.4 Y UNA TEMPERATURA DE 37 °C. CON ESTE ESPECTRO DE DC, PODEMOS DECIR QUE LA ScTIM, ESTA PLEGADA DE MANERA CORRECTA.

4.3. Espectro de masas de la ScTIM.

En la figura 4.9 se muestra el espectro de masas de la ScTIM donde pueden observarse las señales debidas a $[M+1H]^+$, $[M+2H]^{+2}$ y $[M+4H]^{+4}$ cuya relación m/z son: 53,298.96, 26,657.05 y 13,329.01, correspondientes al tetrámero, dímero y monómero respectivamente de la ScTIM.

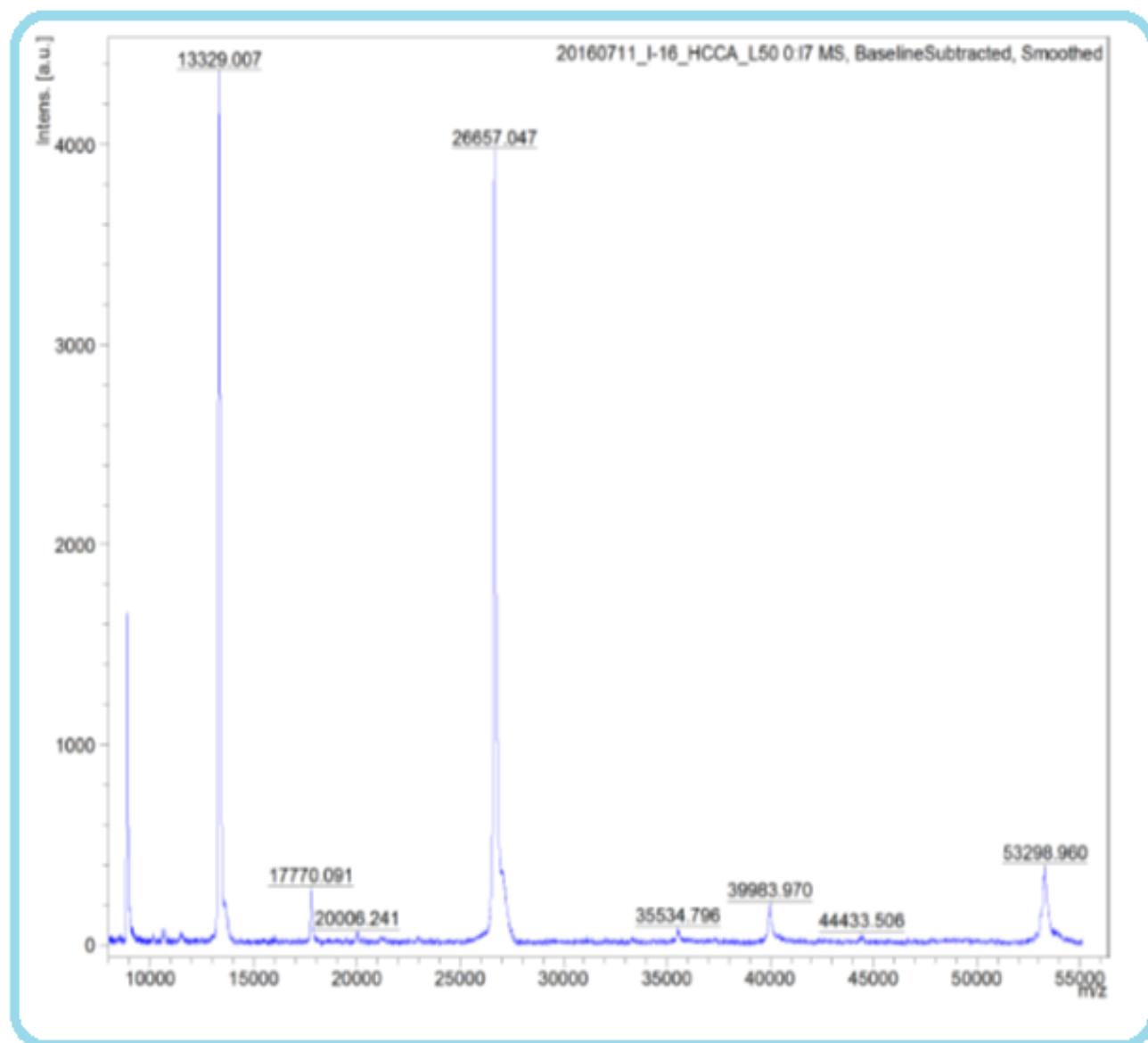


FIGURA 4.9. ESPECTRO DE MASAS DE LA ScTIM, OCUPANDO PARA ELLO 2 μ L, DE MUESTRA, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE LA UAM-I,

4.4. Ensayo de actividad enzimática de la ScTIM.

La Figura 4.10 muestra una medición típica de la actividad enzimática de la ScTIM, que representa la disminución de la absorbancia de la solución a 340 nm debido a la oxidación del NADH por parte de la DHAP. Una vez convertida la pendiente de dicha gráfica de (UA min⁻¹) a (μM s⁻¹), utilizando el coeficiente de absortividad del NADH, obtenemos la velocidad de catálisis (V_o).

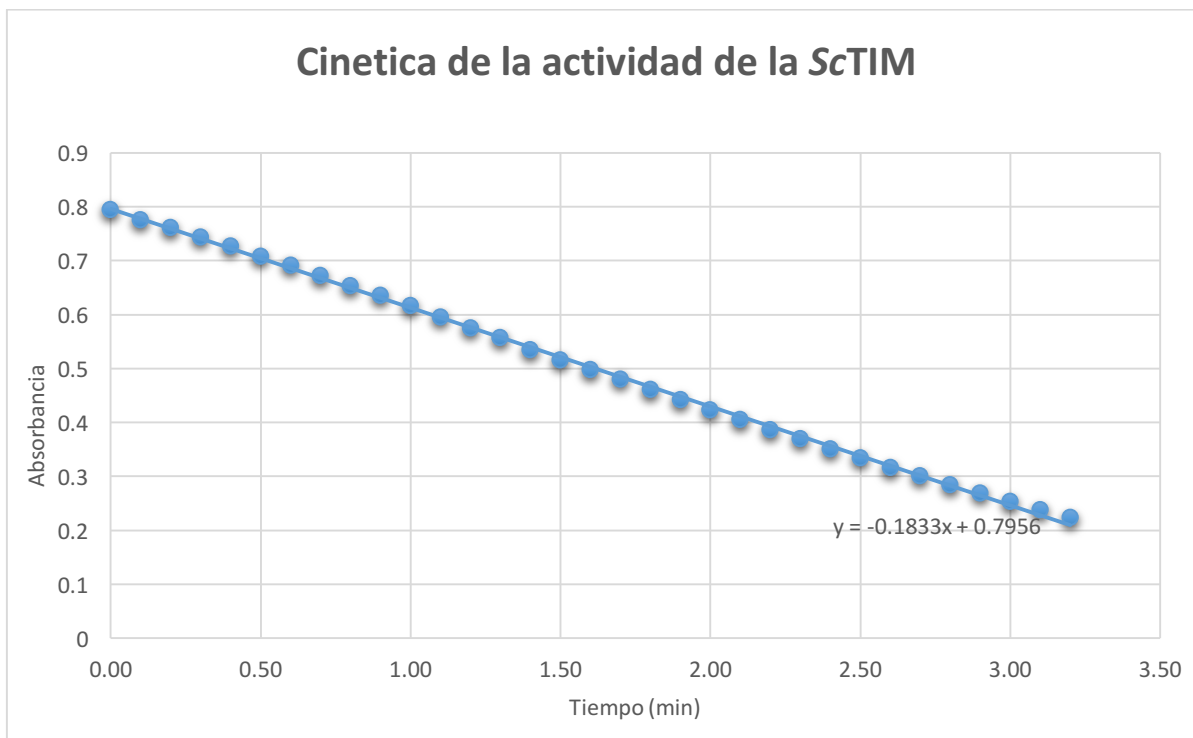


FIGURA 4.10.- SE OBSERVA CINÉTICA DE ACTIVIDAD DE TIM.

El ensayo de actividad enzimática se realizó a diferentes concentraciones de enzima, tal como se muestra en la Tabla 4.1, los cálculos de V_{max} se realizaron aplicando la ecuación de Michaelis- Menten:

$$\text{Ecuación de Michaelis-Menten}$$

$$V_o = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

[G3P] mM	TIM (ng / mL)	UA min ⁻¹	V _o (μM / min)	V _{max} (μM/s)	k _{cat} (s ⁻¹)
a.) 0.8	2.540	0.411	1.18	1.18	3683
b.) 0.8	2.640	0.250	0.69	0.69	2031
c.) 0.8	1.770	0.183	0.491	0.491	2164
d.) 0.8	0.890	0.082	0.22	0.22	1931

TABLA 4.1. SE ILUSTRAN LAS CANTIDADES DE ENZIMA Y SUSTRATO UTILIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

DONDE K_{CAT} ES LA CONSTANTE CATALÍTICA, V_o ES LA VELOCIDAD INICIAL DE LA REACCIÓN, V_{max}, ES LA VELOCIDAD MÁXIMA Y UAmin⁻¹, SON UNIDADES DE ABSORBANCIA.

4.5. Espectro de fluorescencia: TIM libre y complejo TIM-3PG.

Para poder determinar la constante de unión de un ligando a una proteína mediante fluorescencia, es necesario que la fluorescencia intrínseca de la proteína se modifique al formarse el complejo proteína-ligando. Por ello, se obtuvieron los espectros de emisión de la *ScTIM* con y sin el inhibidor 3-fosfoglicerato a fin de detectar posibles cambios en el espectro. En la figura 4.11, se muestran dichos espectros, uno de la *ScTIM* sola a $1.87 \mu\text{M}$ y otro de la *ScTIM* a la misma concentración en presencia de 3-fosfoglicerato 3.6 mM (dando una relación molar 3PG/*ScTIM* de 1940). Puede notarse como ambos espectros son prácticamente iguales, por lo que no se ve factible medir la constante de unión del 3PG mediante esta técnica.

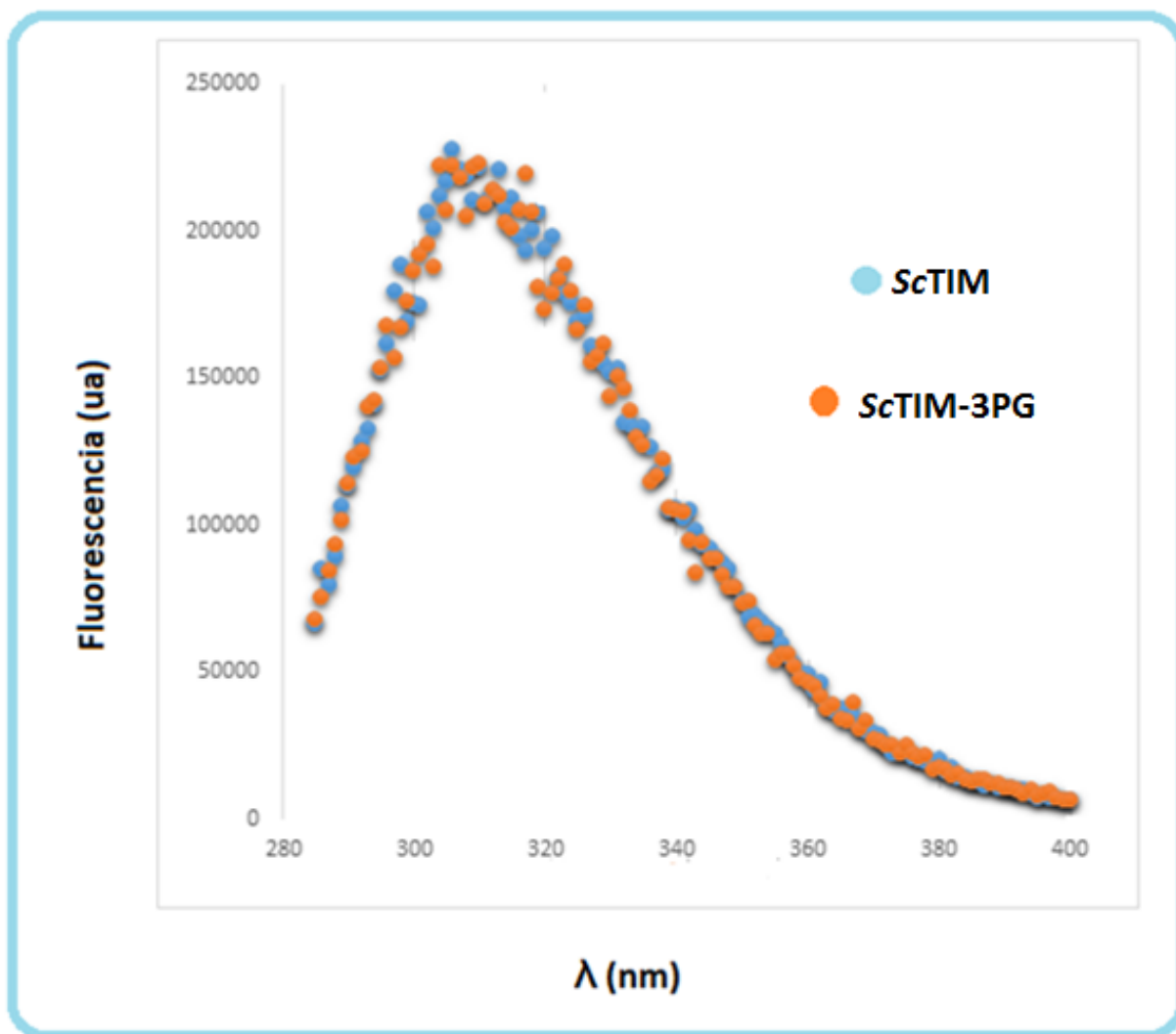


FIGURA 4.11. SE MUESTRAN LOS ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LA *ScTIM* $1.9 \mu\text{M}$ EN AUSENCIA (•) Y EN PRESENCIA DE INHIBIDOR 3PG 3.6 mM (•). La *ScTIM*, se preparó en buffer Tris 0.114M , 5mM EDTA. pH 7.4 .

4.6. Calorimetría de titulación isotérmica.

Debido a la baja afinidad del inhibidor 3PG, comparada con los inhibidores 2-fosfoglicolato y fosfoglicolohidroxamato, fue necesario trabajar con soluciones más concentradas. Ello nos llevó a realizar varios experimentos calorimétricos exploratorios, buscando no tener calores de dilución muy altos del ligando, pero sí medir calores suficientemente grandes al titular la ScTIM con el 3PG. La Figura 4.12 muestra el resultado de un experimento exitoso de ITC en el que se tituló una solución de ScTIM 12.7 μM con pequeñas adiciones (entre 1.0 y 2.0 μL , ver Tabla 3.3) de 3PG 30 mM.

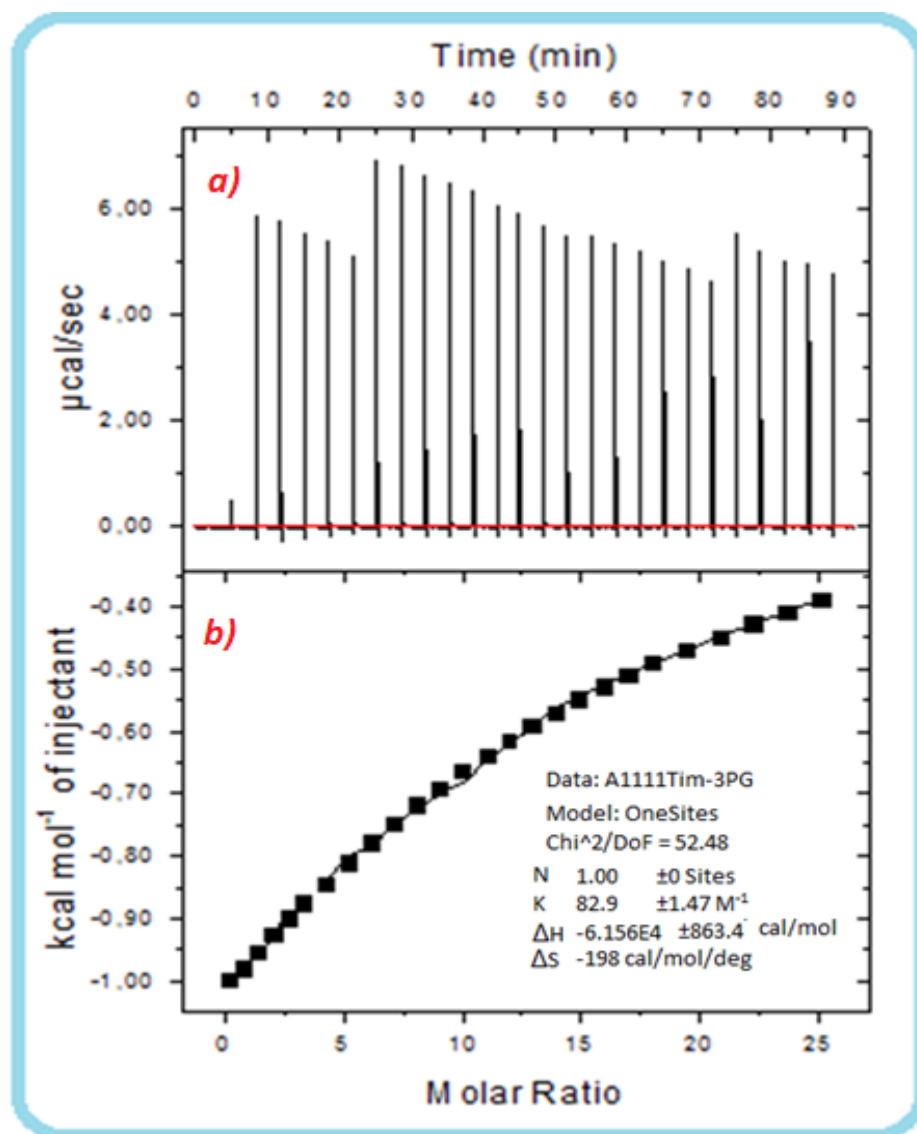


FIGURA 4.12. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA PARA EL COMPLEJO ScTIM-3PG. EN EL PANEL a) MUESTRA LAS INYECCIONES REALIZADAS DE LIGANDO LAS CUALES SE REALIZARON DURANTE UN TIEMPO DE 90min. EL PANEL b) MUESTRA LA ISOTERMA DE UNIÓN CON LOS DATOS EXPERIMENTALES Y LA CURVA CONTINUA RESULTADO DE LA REGRESIÓN NO LINEAL AL MODELO DE UNIÓN A UN SITIO.

CAPITULO V: DISCUSIÓN.

La construcción del plásmido de expresión con el gen de la *ScTIM* fue exitoso, al igual que la expresión de la enzima en *E. coli* (ver figuras 4.1 y 4.2). Los análisis de los geles de electroforesis en presencia de SDS de las diferentes fracciones obtenidas en cada etapa de purificación, muestran la presencia abundante de la enzima (ver figuras 4.3, 4.4, 4.5 y 4.7). El rendimiento obtenido fue de alrededor de 88 mg de proteína por litro de cultivo.

La homogeneidad de la preparación final obtenida de la *ScTIM* se verificó por la ausencia de otras bandas en el análisis electroforético SDS PAGE, la simetría y unicidad del pico cromatográfico de FPLC (figura 4.6) y la ausencia de señales adicionales significativas en el espectro de masa que no sean debidas a la *ScTIM*. La masa de la *ScTIM* obtenida por espectrometría de masas concuerda con la esperada de acuerdo con su secuencia de aminoácidos (26,650 Da por monómero) figura 4.9.

En cuanto a la estructura de la *ScTIM* recombinante, el espectro de DC obtenido en la zona del UV-lejano es bastante similar al reportado previamente ($\alpha=43$, $\beta=17$) con la forma esperada para una proteína con el plegamiento de barril *ScTIM*, que es una mezcla de estructuras de hélice alfa y hoja beta (43% α , 17% β). En la Figura 5.1, se compara el espectro de DC obtenido en este trabajo con el publicado anteriormente para esta enzima [80].

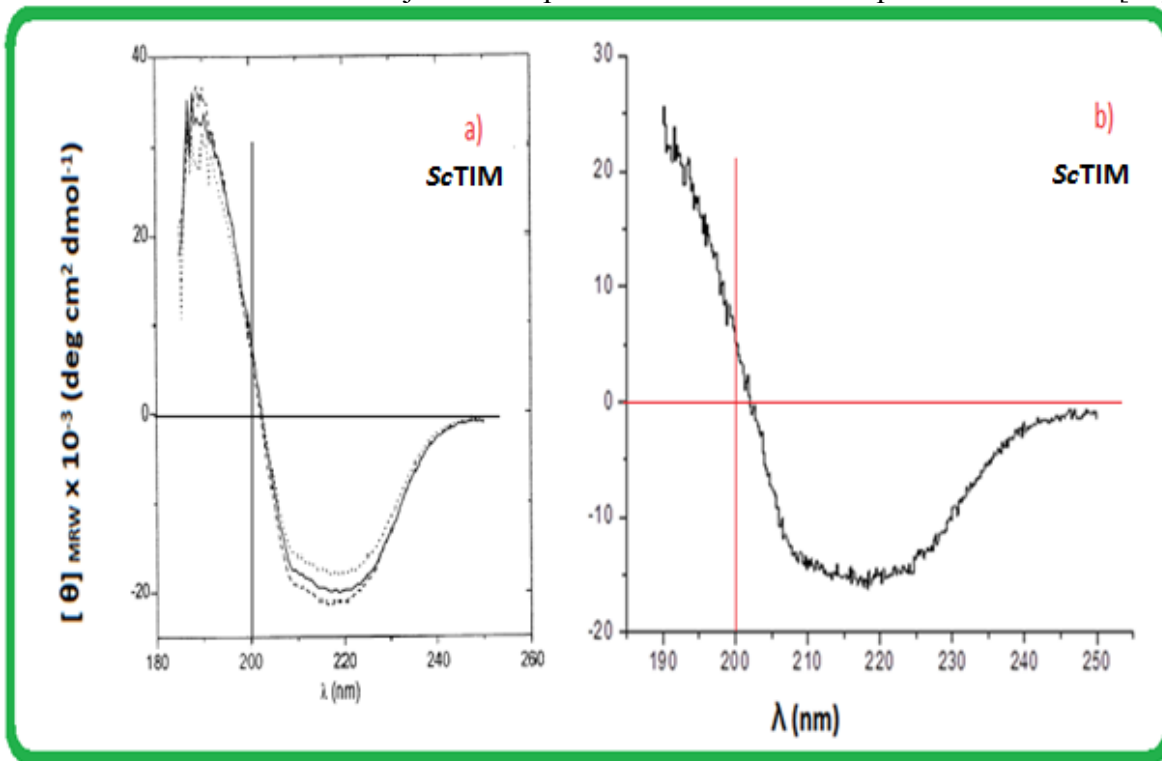


FIGURA 5.1 COMPARACIÓN DE ESPECTROS DE DICOÍSMO CIRCULAR DE LA *ScTIM* A) [72], B) ESPECTRO DE DC MOSTRADO EN LOS RESULTADOS (PH: 7.4, 25 °C). DONDE $[\theta]$ ES LA ELIPTICIDAD MOLAR Y (λ) ES LA LONGITUD DE ONDA.

A pesar de que no se pudieron realizar estudios del efecto del sustrato en la velocidad de catálisis enzimática, si fue posible medir la actividad enzimática a diferentes concentraciones

de proteína, obteniendo valores semejantes a los ya reportados [67, 81,82]. Esta enzima recombinante se obtuvo entonces en una conformación nativa, capaz de reconocer a sus sustratos y unirlos con buena afinidad.

Se intentó medir la constante de unión del inhibidor 3PG a la ScTIM a través de titulaciones fluorimétricas. Sin embargo, podemos decir que no se observaron cambios significativos en el espectro de emisión de la enzima al unir este ligando, por lo que no es posible distinguir el estado libre del acomplejado, lo que imposibilita la determinación de la constante de unión con esta metodología. Siendo la técnica de ITC, la más adecuada para la determinación de la K_u .

Tras haber realizado varios experimentos de ITC, se lograron encontrar condiciones para hacer mediciones confiables, con menor interferencia de la dilución del ligando 3GP. Los parámetros termodinámicos de unión obtenidos en el experimento mostrado en la Fig. 4.12 indican una baja afinidad de la ScTIM por el G3P ($K_u = 82.9 \pm 1.5$) con una entalpía de unión favorable ($\Delta H_U = -61.6 \pm 0.9$ kcal/mol).

Con los parámetros obtenidos (K_u y ΔH_U) pudimos calcular la contribución entrópica ($T\Delta S_U$) a la energía libre de unión mediante las ecuaciones termodinámicas 1.2 y 1.3:

$$T \Delta S_U = \Delta H_U + RT \ln K_u \quad \text{Ec. 5.1}$$

La Tabla 5.1 muestra los valores de los parámetros termodinámicos de la unión enzima-inhibidor.

ΔG_u	ΔH_u	$-T \Delta S_u$	K_u	T
-2.6 kcal/mol	-61.6 kcal/mol	59.0 kcal/mol	82.9 M^{-1}	298.15 K

Tabla (5.1). Parámetros termodinámicos de la formación del complejo ScTIM-3PG a pH 7.4 y 25 °C

En un trabajo de investigación donde se obtuvo la constante de inhibición enzimática (K_I) para diferentes inhibidores de la ScTIM [83], se reportó una K_I de 1.1 mM para el inhibidor 3-DL-fosfoglicerato, es decir para una mezcla racémica de los isómeros L y D del 3GP. Dado que K_I equivale a la constante de disociación (K_d) del complejo enzima-inhibidor, la constante de unión respectiva sería $K_u = 1/K_I = 909$, que es un orden de magnitud mayor a la determinada en este trabajo. Cabe mencionar que la comparación no es del todo correcta pues el valor obtenido por inhibición enzimática es producto de la acción de los dos isómeros.

En la siguiente tabla 5.2 se muestran los parámetros termodinámicos de unión a la ScTIM con los inhibidores PGH y 2PG respectivamente [84].

ΔG_u	ΔH_u	$-T \Delta S_u$	K_u	T
-29.8 kcal/mol	-60.9 kcal/mol	-31.1 kcal/mol	$1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	298.15 K
-27.38 kcal/mol	-40.5 kcal/mol	-13.07 kcal/mol	$6.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	298.15 K

Tabla (5.2). Parámetros termodinámicos de unión de los inhibidores PGH y 2PG ala ScTIM.

Conclusiones:

- Se logró expresar y purificar la ScTIM con un buen rendimiento y con una pureza adecuada.
- La enzima obtenida presenta una actividad enzimática comparable a la reportada en otros trabajos.
- La técnica de fluorescencia no parece ser adecuada para medir la constante de unión del inhibidor 3-D-fosfoglicolato a la ScTIM de levadura.
- La afinidad que presenta el inhibidor 3-D-fosfoglicolato es baja, con una constante de unión (K_u) = de 82.9 M^{-1} .
- El proceso de unión está entálpicamente dirigido con una entropía de unión desfavorable.

Perspectivas:

- Realizar experimentos de titulación a temperatura menores, donde se esperaría una mayor afinidad dado que la unión del complejo *ScTIM*-3PG es exotérmica.
- Estudiar la termodinámica de unión del complejo *ScTIM*-3PG a diferentes valores de pH.
- Intentar la cristalización de la *ScTIM* en presencia del inhibidor 3PG para posteriormente determinar su estructura por difracción de Rayos X.
- Realizar simulaciones de dinámica molecular para determinar las energías libres de unión de la *ScTIM* con 3PG y los otros inhibidores ya caracterizados.

Bibliografía:

- [1]. Segunda parte de la medicina y cirugía, que trata de las úlceras en general y particular, y del Antidotario, en el cual se trata de la facultad de todos los medicamentos así simples como compuestos según Gal. Juan Calvo Cirujano Valencia. España en casa de Juan Chrysostomo Garriz, 1599.
- [2]. Clive Ferguson. Historical introduction to the Development of Material Science and Engineering as a Teaching Discipline. Education for Materials. Higher U.K Centre (2010).
- [3]. Materials science and engineering an introduction, William D. Callister Jr, David G. Rethwisch John Wiley and Sons Eight edition, (2009).
- [4]. Turab Gurbanov, *El petróleo del Caspio y la política exterior de Azerbaiyán : tomo 1- Cuestiones económicas y jurídicas*, Harmattan, 2007, 304-312
- [5]. Tessy María López Goerne, Nanotecnología y nanomedicina: La ciencia del futuro....Hoy, Mexico, D.F, Arkhe Ediciones, (2011).
- [6]. The intersection of biology and materials science George M. Whitesides, Amy P. Wong Materials Research Society Spring Harvard University 2005.
- [7]. Mallet, J. & Joron, M. Evolution of diversity in warning color and mimicry: polymorphisms, shifting balance and speciation. Annual Review of Ecology and Systematics 30:201–233, (1999).
- [8]. Clive Ferguson. Historical introduction to the Development of Material Science and Engineering as a Teaching Discipline. Education for Materials. Higher U.K Centre (2010)
- [9]. Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen and Jack E. Lemons. Biomaterials Science, Elsevier Inc. third Edition (2013).
- [10]. Meyers, M. A.; Chen, P. Y.; Lin, A. Y. M.; Seki, Y. "Biological materials: Structure and mechanical properties". Progress in Materials Science **53**: 1 (2008).
- [11]. Shinomiya K, Itoh S, Kawauchi T, Kikuchi M, Tanaka J. Development of a novel hydroxyapatite/ collagen composite, Biomaterial. Tissue Eng Therap ,Use, 5: 165–77, (2001).
- [12]. Luis C. Mendes, Geysy L. Ribero, Raphaella C. Marques In situ Hydroxyapatite Synthesis: Influence of Collagen on its Structural and Morphological Characteristics, Materials Sciences and Applications, 3, 580-586, (2012).

- [13]. William F. Hosford, Elementary Materials Science, ASM International, First Edition 16-17, 2013
- [14]. Introduction to soft matter: polymers, colloids, amphiphiles and liquid cristal de Ian W. Hamley. John Wiley and Song , (2000).
- [15]. Informacion tomada de la pagina: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/-laureates/1991/gennes-bio.html>
- [16]. Soft matter Nobel lecture, College de France, Pierre- Gilles De Gennes, Paris France December 9, (1991).
- [17]. J. L. Atwood, Jonathan W. Steed Supramolecular Chemistry CCR Press United States of America (2007).
- [18]. M. Kleman and O. D. Lavrentovich, *Soft Matter Physics: An Introduction*, Springer United States of America, (2003).
- [19]. Información tomada de la página http://www.researchgate.net/journal/1539-445x_Soft_Materials
- [20]. *Soft Matter* Where physics, chemistry and biology meet engineering D. Schlüter and J. Vermant Federal Institute of Technology Swiss: 7: (2016).
- [21]. Introduction to Soft Matter Synthetic and Biological Self-Assembling Materials Ian. W. Hamley John Wiley and Song, (2013)
- [22]. Supramolecular chemistry second edition Jonathan W. Steed and Jerry L. Atwood John Wiley and Song 209–210, (2012)
- [23]. Toward complex matter: Supramolecular chemistry Jean-Marie Lehn University, Louis Pasteur Paris France (2002).
- [24]. Dendrimeros II: Architecture, Nanostructure and Supramolecular Chemistry, Fritz Vögtle Springer Science & Business Media Volumen 210: 2000.
- [25]. Química bioorgánica y productos naturales, Rosa. M. Claramunt, M. de los Ángeles Farrán Morales, Concepción López García, Martha Pérez Torralba, Dolores Santa María Gutierrez, Universidad de Educación a Distancia Madrid 2013.
- [26]. Latetotoxicity following curative treatment of testicular cancer. Semin Surg Oncol. Kollmann- sberger C, Kuzcyk M, Mayer F, Hartmann JT, Kanz L, Bokemeyer C.. 17(4):81-275;1999.

[26] Químic inorgànica avanzada, F Albert Cotton, Geoffrey Wilkinson, Limusa Wiley cuarta edicion: 156-158, 2006.

[27]. Kayed A. Abu-Safieh, Adnan S. Abu-Surrah, Hani D. Tabb, Huda A. AlMasri, RandaM. Bawadi, Fadila M. Boudjelal, and Lubna H. Tahtamouni., Novel Palladium(II) and Platinum(II) Complexes with a Fluoropiperazinyl Based Ligand Exhibiting High Cytotoxicity and Anticancer Activity *In Vitro*, Journal of Chemistry, Volume2016, Article ID 7508724, 7pages

[28]. Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry Karl J. Wallace, Jonathan W. Steed, David R. Turner Jhon Wiley and Song, Ltd: 75, 2007 [27]. A journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker The key-lock theory and the induced fit theory, Daniel Eduard Koshland, 33,2375-2378, 1995

[29]. Structure in Protein Chemistry. , Kyte, Jack., Garland Publishing Inc. New York & London. Second edition, 2007.

[30]. Van der Waals Forces, V. Adrian. Parsegian, a handbook for biologists, chemists, engineers, and physicists, Cambridge University Press: 16-24, 2006

[31]. Informaciòn tomada de la pàgina: <https://quimica2bac.wordpress.com/2010/12/09/fuerzas-intermoleculares-fuerzas-de-van-der>.

[32]. Electromagnetics, John D. Kraus and Keith R. Carver, second edition McGraw-Hill Inc, 2013.

[33]. Imagen tomada y modificada de la direccion: <https://bioquibi.webs.ull.es/temascompletos-/InteraccionesNC/inicio.htm>

[34]. David Whitford, Proteins Structure and Function, John Wiley and Song Ltd, 23-25, 2005.

[35]. Imagen tomada y modificada de la pagina: <http://www.ehu.eus/biomoleculas/proteins/-/prot43.htm>.

[36]. Biochemistry, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, and Lubert Stryer, W. H. Freeman and company, 2002.

[37]. Silvia. R. Leicach, Estructura y rol en el crecimiento y supervivencia de las plantas, segunda edicion, 34-35: 2014

[38]. Jean Pierre Sauvage, Chemistry Perspectives in Supramolecular Chemistry, volumen 5, Wiley and Song Ltd, 56-58, 1999.

[39]. Engineering of the interactions between proteins and their ligands Alejandro Sosa 123-124 2014 Peinado

- [40]. Gregory A. y Dagmar R. In Protein Structure and Function 1er Ed, NewSciencePress, NY, (2003).
- [41]. Drug Discovery Today: Technologies Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization Ernesto Freire Department of Biology, Johns Hopkins. Vol I, No. 32004
- [42]. Biochemistry, Electrophilic catalysis in triosephosphate isomerase: the role of histidine-95 Komives, Elizabeth .A. Komives, Louise. C. Chang, . L. Elias. Lolis, , et al. (1991). , 30, 3011.
- [43]. Harvey R., Champe P. y Ferrier D. (2005)Bioquímica; 3a edición; McGraw-Hill
- [44]. Knowles, J.R. & Albery, W.J. (1977). Perfection in enzyme catalysis: The energetics of triosephosphate isomerase. *Acc. Chem. Res.* 10, 105-111.
- [45]. Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, 350, 121-124.
- [46]. Orosz F, Oláh J, Ovádi J. Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. *IUBMB Life*. 2006;58(12):703-15.
- [47]. Garza-Ramos, G., Cabrera,. Saavedra-Lira, E., Tuena de Gomez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Perez-Montfort, R., y Gomez-Puyou, A. (1998) *Eur. J. Biochem.* 253:684-91.
- [48]. Organizacion Mundial de la Salud, Resumen Mundial sobre el Paludismo 2015 (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205559/1/WHO_HTM_GMP_2016.2_spa.pdf?ua=1).
- [49].Josephine E. Siregar, Christina L. Faust, Lydia S.Murdiyarso, Lis Rosmanah, Uus Saepuloh, Andrew P. Dobson, and Diah Iskandriati Non-invasive surveillance for Plasmodium in reservoir macaque species,. *Malaria Journal*, 14:404, 2015.
- [50]. The *World Malaria Report 2014* summarizes information received from malaria-endemic countries and other sources, and updates the analyses presented in the 2013 report, http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/#.

- [51]. Wierenga, R. K., Noble, M.E.M., Vriend, G., Nauchche, S. y Hol, W. G. J. (1991) J. Mol. Biol. 220 : 995-1015.
- [52]. Alahuhta, M. & Wierenga, R. (2010). Atomic resolution crystallography of a complex of triosephosphate isomerase with a reaction-intermediate analog: new insight in the proton transfer reaction mechanism. Proteins: Struct. Funct. Bioinform. 78, 1878–1888.
- [53] Lolis, E. y Petsko, A. G., (1990) Biochemistry 29:6619-6625.
- [54]. Noble, M. E. M., Zeelen, J.P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gahimont, A.-C. y Martial, J. A. (1993) Acta Crystallogr. Sec. D.49 : 403-17
- [55]. Lolis, E., Alber, T. Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C. y Petsko, A.G. (1990). Biochemistry 29 : 6609-18.
- [56]. Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G. A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., y Wilson, I.A. (1975) Nature 255: 609-14
- [57]. Mande, S.C., Mainfroid, V., Kalk, K.H., Goraj, K., Martial, J.A. y Hol, W.G.J., (1994) Protein Sci. 3 : 810-21.
- [58]. Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G. Tuena, de Gómez- Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Pérez-Monfort, R., (1998) J. Mol. Biol. 283: 193-203.
- [59]. Alvarez, M., Zeelen, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K. y Maes, D. (1998) J. Biol. Chem. 273: 2199-2206.
- [60]. Kursula, I., Partanen, S., Lambeir, A.-M., Antonov, A.M., Augustyns, K., y Wierenga, R.K. (2001) Eur. J. Biochemistry 30: 3011-19.
- [61]. Symersky, J., Li, S., Carson, M., Lou, M. (2003) Proteins 15:484-86.
- [62]. Williams, J.C., Zeelen, J. Ph., Neubauer, G.M., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P.A.M., Lambeir, A.-M. y Wierenga, R.K. (1999) Protein Engng. 12:234-50.
- [63]. Russel, R.J. y Tylor, G.L., (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6:370-4
- [64]. Valanker, S.S., Ray, S.S., Gokhale, R.S., S., Balaram, H., Balaram, P. y Murthy, M.R.N. (1997) Structure 5: 751-61.
- [65]. Informacion tomada del sitio, YASARA (<http://www.yasara.org>).
- [66]. Patsalos PN. *Antiepileptic drug pharmacogenetics*. Ther Drug Monit. 2000feb; 22(1):127-30.

[67]. Zhang, Z., Sugio, S., Komives, E.A., Liu, K.D., Knowles, J.R., Petsko, G.A. & Ringe, D. (1994). Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 2830-287.

[68a]. <https://www.genscript.com/protein-expression-and-purification-overview.html>.

[69]. Equilibrium unfolding of yeast Triosephosphate Isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea., Edgar Vázquez-Contreras, Rafael A. Zubillaga, Guillermo Mendoza-Hernández, Miguel Costas and D. Alejandro Fernández-Velasco., Protein and Peptide Letters, Vol. 7 No. 1, pp 57-64, 200 Bentham Science Publishers B. V.

[70]. Norton, I.L. and Hartman, F.C. (1972). *Biochemistry* **11**, 4435-4441.

[71]. Berova N., Nakanishi K., Woody R.W. 2000. Circular Dichroism: Principles and Applications, 2nd edn. New York, USA: Wiley VCH.

[72]. Bode K. A. and Applequist J., J. 1996 . Improved theoretical $\pi - \pi^*$ absorption and circular dichroic spectra of helical polypeptides using new polarizabilities of atoms and NC'O chromophores *Phys. Chem.* **100**, 17825 –17834.

[73]. Ranjbar, B., Gill, P. 2009. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses: a review. *Chem. Biol. Drug Des.* **74**, 101–120.

[74]. Hammes G.G. 2005. Spectroscopy for the Biological Sciences. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.

[75]. Hope J., Shearman M.S., Baxter H.C., Chong A., Kelly S.M., Price N.C. 1996 Cytotoxicity of prion protein peptide (PrP106126) differs in mechanism from the cytotoxic activity of the Alzheimer's disease amyloid peptide, *Am J Pathol.* **151**, 25–35. *Neurodegeneration*; **5**:1–11.

[76] LIN, Y.; YU, Q.; HANG, W.; HUANG, B. «Progress of laser ionization mass spectrometry for elemental analysis - A review of the past decade», *Spectrochimica Acta Part B*, **65** (2010), pp. 871-883.

[77] Robert K. Murray, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, Victor W Rodwell, P. Anthony Weil, Bioquímica ilustrada Harper, McGraw-Hill (2013), 29ª edición pp: 128-131.

[78] David L. Nelson, Michael M. Cox, Principios de Bioquímica Lehninger quinta edición 2009-2016, 2014.

- [79]. Sampson, N. S. & Knowles, J.R. (1992). Segmental movement: definition of the structural requirements for loop closure in catalysis by triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **31**, 8482-8487.
- [80]. Edith Gonzalez Mondragon, Rafael A. Zubillaga, Emma Saavedra, Maria Elena Chanèz Cardenas, Ruy Pèrez Montfort, Andres Hernandez Arana Conserved Cysteine 126 in Triosephosphate Isomerase Is Required Not for Enzymatic Activity but for Proper Folding and Stability
- [81]. Jeonghoon Sun, Nicole S. Sampson, Understanding Protein Lids: Kinetic Analysis of Active Hinge Mutants in Triosephosphate Isomerase, *Biochemistry*, 38,11474-11481, 1999.
- [82] Lodi, P. J., Chang, L. C., Knowles, J. R. & Komives, E. A. (1994). Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of lysine-12. *Biochemistry*, 33, 2809–2814.
- [83] Anne Marie LAMBEIR, Fred R. OPPERDOES, Rik K, WIERENGA, Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*, *Eur. J. Biochem.* 168,69-74,1987.
- [84]. I.N. Serratos Álvarez, Gerardo Perez Hernandez, Georgina Garza–Ramos, Andrés Hernández–Arana, Edith González–Mondragón and Rafael A. Zubillaga. Binding Thermodynamics of Phosphorylated Inhibitors to Triosephosphate Isomerase and the Contribution of Electrostatic Interactions, *Journal of Molecular Biology*, 405, 158–172 (2011).

Glosario de términos:

Aminoácidos: Son moléculas orgánicas con un grupo amino(-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH). Los aminoácidos más estudiados son los que forman parte de las proteínas.

Bacillus stearothermophilus: es una bacteria Gram-positiva con forma de bacilo que se encuadra en el filo *Firmicutes*. Es una bacteria termófila extensamente distribuida en el suelo, manantiales calientes y sedimentos oceánicos y es causa de descomposición de los productos alimenticios. Es usada comúnmente como organismo de validación en los estudios de esterilización.

Biocatalizador: Son catalizadores que actúan de los seres vivos, reduce o aumenta la energía de activación de una reacción química haciendo que esta sea más rápida o más lenta, se consideran biocatalizadores las enzimas, hormonas y las vitaminas.

Biomacromoléculas: Moléculas de origen biológico que tienen una masa molecular elevada, formadas por un gran número de átomos, el término macromolécula se refiere a las moléculas que pesan más de 10,000 Da de masa atómica.

Cepa: Término usado en microbiología, para designar una variante fenotípica de una especie, o incluso de un taxón inferior, usualmente propagada por clonación. Es un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos una característica.

Cristal líquido: Es un tipo especial de estado de agregación de la materia que tiene propiedades de las fases líquida y sólida. Se suele atribuir el descubrimiento de los cristales líquidos al botánico Friedrich Reinitzer que en 1888 encontró una sustancia que parecía tener dos puntos de fusión. Un año más tarde Otto Lehmann solventó el problema con la descripción de un nuevo estado de la materia medio entre un líquido y un cristal. Finalmente, Friedel, en 1922, fue quien habló por primera vez de "mesofase".

Densidad Óptica: Es una magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda dada. Mientras más alta es la densidad óptica, más corta es la transmitancia.

Escherichia coli: También conocida por la abreviación de su nombre, *E. coli*, es quizás el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se lo puede encontrar en multitud de ambientes, dado que es un organismo ubicuo.

E. histolytica: *Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito anaerobio con forma ameboideo, como su nombre lo indica, dentro del género *Entamoeba*. Es patógeno para el humano y para los cánidos, causando amebiasis incluyendo colitis amébrica y absceso hepático.

Electroforesis: Es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un

soporte sólido (p. ej., electroforesis en papel o en acetato de celulosa), a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

Ensamblaje supramolecular: También conocido como supermolécula, es una estructura determinada por un complejo de moléculas unidas por un enlace que no es covalente. Este ensamblaje supramolecular puede estar compuesto por dos moléculas, como lo es la doble hélice del ADN. Se utiliza normalmente para expresar complejos más grandes de forma como lo son el de esfera, vara o planos en especies. La dimensión de este ensamblaje se puede determinar en un rango de nanómetros a micrómetros. Por ende, acepta objetos de la escala nanométrica, donde estos pueden entrar en menos pasos que una molecular de dimensión similar.

Enzima: son moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles: una enzima hace que una reacción química que es energéticamente posible, pero que transcurre a una velocidad muy baja, sea cinéticamente favorable, es decir, transcurra a mayor velocidad que sin la presencia de la enzima. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos.

Expresión: La **expresión génica** es el proceso por medio del cual todos los microorganismos procariotas y células eucariotas transforman la información codificada por los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo, funcionamiento y reproducción con otros organismos. La expresión génica es clave para la creación de un fenotipo.

Fluoruro fenil sulfonio: En bioquímica, el PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*) es un inhibidor de proteasas de serina usado comúnmente en la preparación de lisados celulares, en los que preserva a las proteínas celulares de su digestión por proteasas. Aunque actúa específicamente sobre proteasas de serina, no inhibe todas las enzimas conocidas de este tipo. Se descompone rápidamente en agua (vida media de 110 min a pH 7 y 35 min a pH 8) de modo que es preparado en disoluciones de alcohol anhidro, isopropanol, aceite de maíz o DMSO. La inhibición de la proteólisis ocurre cuando se utiliza a una concentración de entre 0,1 y 1 mM.

Fosfoglicolohidroxamato (PGH): Moléculas formadas por... y que son inhibidores de la triosa fosfato isomerasa.

Hospedero o huésped: En biología, se llama huésped, hospedador, hospedante y hospedero a aquel organismo que alberga a otro en su interior o que lo porta sobre sí, ya sea en una simbiosis de comensal o un mutualista.

Isomerización: Es el proceso químico mediante el cual una molécula es transformada en otra que posee los mismos átomos pero dispuestos de forma distinta. De este modo, se dice que la primera molécula es un isómero de la segunda, y viceversa. En algunos casos y para algunas moléculas, la isomerización puede suceder espontáneamente. De hecho, algunos isómeros poseen aproximadamente la misma energía de enlace, lo que conduce a que se

presenten en cantidades más o menos iguales que se interconvierten entre sí. La diferencia de energía existente entre dos isómeros se denomina energía de isomerización.

Lisar o lisis celular: es el proceso de ruptura de la membrana celular que produce la salida del material intracelular. Todas las células tienen una membrana hecha de fosfolípidos que separan el contenido celular del medio extracelular.

Materia blanda: Subcampo de la materia condensada, esta es también una parte de la ciencia de los materiales es (multidisciplinaria), se relaciona ampliamente con los estudios de sistemas que se encuentran en la frontera de los líquidos simples y los sólidos así como se involucra el estudio de los materiales biológicos.

Medio Luria Bertani (LB): Es uno de los medios más utilizados para el mantenimiento y cultivo de cepas de laboratorio recombinante de *Escherichia coli* para estudios fisiológicos. La fórmula generalmente difiere en la cantidad de cloruro sódico, para así proveer de las condiciones osmóticas adecuadas para una cepa bacteriana concreta y unas condiciones de cultivo deseadas. Las fórmulas bajas en sal, Lennox y Luria, son ideales para cultivos que requieren antibióticos sensibles a la sal.

Paquete celular: es el estudio, del perfil o el estado sanguíneo, los cuales son: recuento de eritrocitos (y valor hematocrito), recuento de leucocitos, determinación de hemoglobina, velocidad de sedimentación globular (VSG) y fórmula leucocitaria (recuento diferencial de leucocitos).

Plásmido: Son moléculas de ADN extracromosómico circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula.

Plasmodium falciparum: es un protozoo parásito, una de las especies del género *Plasmodium* que causa malaria en humanos. Es transmitida por mosquitos *Anopheles*. Se pueden observar diferentes fases evolutivas, en el mosquito *Anopheles* (donde se reproduce el parásito), en el interior de los hepatocitos y en el interior de los glóbulos rojos del hospedador humano.

P. falciparum transmite la forma más peligrosa de malaria con los índices más altos de complicaciones y mortalidad, productor del 80% de todas las infecciones de malaria y 90% de las muertes por la enfermedad. Su prevalencia predomina en el África subsahariana, más que en otras áreas del mundo. Es el único capaz de producir malaria cerebral. Causa la muerte por coma y anemia. Invade cualquier tipo de eritrocitos y produce el paludismo terciario maligno. Es frecuente la coinfección por VIH.

Proteína recombinante: también llamadas proteínas quiméricas o proteínas heterólogas, son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado en una especie o una línea celular distinta a la célula original. Un ejemplo de proteína recombinante es la insulina humana generada in vitro, obtenida a partir de cultivos de la bacteria *E. coli*. Anteriormente se recogía directamente a partir del páncreas del cerdo. Para obtener una proteína recombinante, se parte de ADN recombinante, que no es más que una molécula de ADN artificial formada de manera

deliberada in vitro insertando secuencias de ADN provenientes de un organismo en el genoma de un organismos diferente, por ejemplo ADN humano insertado en el de la bacteria *E. coli*. El ADN recombinante da lugar a la proteína recombinante que interesa obtener. Un tipo de proteínas recombinantes son las proteínas de fusión, originadas al unir artificialmente dos o más genes que darán lugar a una única proteína suma de las 2 anteriores.

Receptores artificiales: Un receptor es una estructura de un ser vivo que detecta diferentes estímulos del medio y los transmite al sistema nervioso para que este genere una respuesta mediante un efecto.

Reconocimiento molecular: El estudio de las interacciones específicas entre moléculas. Incluye el campo de estudio de la química supramolecular.

Resuspensión: Centrifugación diferencial de un material celular, posteriormente, se descarta el líquido sobrenadante y a la pastilla (también llamado pellet) que se forma se le agrega un volumen de buffer o agua estéril, por lo general más pequeño que el primero. Se agita y el pellet queda disuelto nuevamente, a eso se le llama resuspender.

Sacharomyces cerevisiae: Especie de levadura, es un hongo unicelular, un tipo de levadura utilizado industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino. En su ciclo de vida alternan dos formas, una haploide y otra diploide. Ambas formas se reproducen de forma asexual por gemación. En condiciones muy determinadas la forma diploide es capaz de reproducirse sexualmente. En estos casos se produce la meiosis en la célula formándose un asca que contiene cuatro ascosporas haploides.

SDS: SDS-PAGE es el acrónimo en inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide *gel* electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Es una técnica ampliamente utilizada en bioquímica, genética, biología molecular y ciencia forense para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética (en función de la longitud de la cadena polipeptídica, masa molecular, modificaciones postraduccionales y otros factores).

Sobrenadante: Cuando la reacción se produce en un líquido, el sólido formado se llama el precipitado, o cuando compactado por una centrifugadora, un pellet. El líquido que queda por encima de los sólidos es en cualquier caso llama el sobrenadante.

Sobreexpresión: Inducir su producción en mayor cantidad, e incrementar su función en el organismo

Solución TEA: a trietanolamina, 2,2',2''-nitrilotrietanol ó trihidroxietilamina (frecuentemente abreviada como *TEA* o *trieta* en el mercado de productos químicos) es un compuesto químico orgánico formado, principalmente, por una amina terciaria y tres grupos hidróxilos; su fórmula química es $C_6H_{15}NO_3$. Como otras aminas, la trietanolamina actúa como una base química débil debido al par solitario de electrones en el átomo de nitrógeno.

Solución Tris: Es el nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como tris(hidroximetil) aminometano, de fórmula $(HOCH_2)_3CNH_2$. Se utiliza ampliamente en bioquímica y biología molecular, en particular para preparar disoluciones tampón (por ejemplo, tampones Tris-HCl, Tris-Gly, TAE y TBE). Es una amina primaria, con la

reactividad típica, por ejemplo la condensación con aldehídos y el establecimiento de un equilibrio ácido-base (responsable de su capacidad amortiguadora de pH).

Sustrato: En bioquímica, un Sustrato es una molécula sobre la que actúa una enzima.

Tripanosoma brucei: Es un protista parásito que causa la tripanosomiasis africana (o enfermedad del sueño) en humanos y animales en África. La especie parasita dos huéspedes, un vector insecto (la mosca tse-tse) y un huésped mamífero. Debido a la gran diferencia entre estos dos huéspedes, la célula experimenta cambios complejos para facilitar su supervivencia en el intestino de los insectos y en la sangre de los mamíferos.

Tripanosoma cruzi: es un protista de la clase *Zoomastigophora*, familia *Trypanosomatidae*, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, cuyo genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta región (dentro de la propia mitocondria, y cerca de la base del flagelo), denominada cinetoplasto. Es un parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados. Es el agente que provoca de la enfermedad de Chagas.

Triosafosfato isomerasa (TIM): es una enzima que cataliza la interconversión entre gliceraldehído-3-fosfato (GADP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), reacción que tiene lugar a través de un intermediario enediol. Enzima implicada en la glucólisis, estructuralmente es un homodímero donde cada subunidad posee un cilindro beta paralelo con hélices alfa en los nexos de unión.

